



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

*Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título
de DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS*

**“Evaluación de combinaciones
antimicrobianas/aceite esencial de
Melaleuca armillaris Sm. como alternativas
terapéuticas para el tratamiento de mastitis
bovina por *Staphylococcus aureus*”**

AUTOR: *MSc. BULDAIN, Daniel*

DIRECTORA: *Dra. MESTORINO, Nora*

CODIRECTORA: *Dra. MARCHETTI, María Laura*

LUGAR DE TRABAJO: *Laboratorio de Estudios Farmacológicos y
Toxicológicos (LEFyT)*

MIEMBROS DEL JURADO: *Dr. CALVINHO, Luis*
Dr. DE LA SOTA, Luzbel
Dr. LIFSCHITZ, Adrian

Año 2021

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP por permitirme realizar esta Tesis.

A mi Directora, la Dra. Nora Mestorino, por su guía durante todos estos años, en los que me abrió las puertas de su laboratorio y me brindó sus conocimientos, confianza y entusiasmo.

A Lau, Li y Andre con las que hemos compartido muchos buenos momentos en estos años de trabajo. Así como también a todos aquellos que han formado parte del laboratorio en diferentes etapas y que han sido de gran ayuda.

Al Dr. Bandoni por su ayuda en la caracterización del aceite esencial y su gran predisposición para cualquier consulta.

A CONICET por haberme otorgado una beca para financiar mi doctorado.

A mis padres por ser el mejor ejemplo que seguir, bancándome con absoluta confianza en todo lo que emprendo en esta vida.

A mis hermanos por todo lo que son, la incondicionalidad y ayuda de siempre.

A Juan, Cris, Sofi, Pipi y Juan José por ser mi segunda familia y haberme escuchado hablar de este trabajo tantas veces.

Y por sobre todo a mis grandes amores, Benja y Stefi, que son el gran motor de mi vida.

PUBLICACIONES PARCIALES OBTENIDAS DEL TRABAJO DE TESIS

- 1- **Buldain D**, Buchamer A, Marchetti L, Aliverti F, Borja C, Mestorino N. Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* frente a *Staphylococcus aureus*. Analecta Vet. 2017; 37(2): 33-39. doi: doi.org/10.24215/15142590e014
- 2- **Buldain D**, Buchamer AV, Marchetti ML, Aliverti F, Bandoni A, Mestorino N. Combination of Cloxacillin and Essential Oil of *Melaleuca armillaris* as an Alternative Against *Staphylococcus aureus*. Front Vet Sci. 2018; 5: 177. doi: doi.org/10.3389/fvets.2018.00177
- 3- **Buldain D**, Gortari Castillo L, Buchamer AV, Aliverti F, Bandoni A, Marchetti ML, Mestorino N. *Melaleuca armillaris* essential oil in combination with rifaximin against *Staphylococcus aureus* isolated of dairy cows. Front Vet Sci. 2020; 7: 344. doi: doi.org/10.3389/fvets.2020.00344
- 4- **Buldain D**, Gortari Castillo L, Marchetti ML, Julca Lozano K, Bandoni A, Mestorino N. Modelling the growth and death of *Staphylococcus aureus* against *Melaleuca armillaris* essential oil at different pH conditions. Antibiotics. 2021; 10: 222. doi: doi.org/10.3390/antibiotics10020222

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
<i>Resumen</i>	XXIV
<i>Summary</i>	XXVI
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Mastitis bovina	6
I.2. Antimicrobianos	13
I.2.1. Resistencia a los antimicrobianos	15
I.3. Mastitis por <i>Staphylococcus aureus</i>	18
I.3.1. Tratamiento antimicrobiano de infecciones ocasionadas por <i>S. aureus</i> y sus mecanismos de resistencias	22
I.4. Actividad intracelular de antimicrobianos	26
I.5. Fitoterapia en el tratamiento de la mastitis bovina.	30
I.6. Aceites esenciales	34
I.6.1. Definición y usos comunes	34
I.6.2. Métodos de extracción	36
I.6.3. Factores que inciden en la producción	40
I.6.4. Parámetros de calidad de AEs	40
I.6.5. Propiedades antimicrobianas y mecanismos de acción	42
I.6.6. Combinación con antibióticos	45
I.7. <i>Melaleuca armillaris</i>	46
I.8. Hipótesis	49
I.9. Objetivo general	50
I.9.1. Objetivos específicos	50
II. MATERIALES Y MÉTODOS	52
II.1. Recolección de <i>M. armillaris</i>	52
II.2. Extracción del AE de <i>M. armillaris</i>	52
II.2.1. Caracterización del AE	54
II.3. Aislamientos de campo de <i>Staphylococcus aureus</i>	56
II.4. Evaluación de la susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
II.4.1. Prueba cualitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana	57
II.4.2. Medio de cultivo	58

II.4.3. Inóculo bacteriano	58
II.4.4. Discos de antibiograma	59
II.4.5. Lectura e interpretación de los halos de inhibición	60
II.4.6. Control de calidad	60
II.5. Selección de los antimicrobianos a evaluar	61
II.6. Prueba cuantitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana a los antibióticos	62
II.6.1. Soluciones y diluciones de los antimicrobianos.....	63
II.6.2. Procedimiento.....	64
II.6.3. Preparación de las soluciones de trabajo de los antimicrobianos	65
II.6.4. Análisis estadístico	68
II.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana del AE.....	68
II.7.1. Solución de trabajo de AE	69
II.7.2. Procedimiento.....	69
II.7.3. Análisis estadístico	71
II.8. Evaluación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los antibióticos y del AE	71
II.8.1. Análisis estadístico	72
II.9. Determinación de actividad antimicrobiana AE/antibiótico.....	72
II.9.1. Procedimiento.....	73
II.10. Ensayo de curva de muerte o letalidad bacteriana	76
II.10.1. Procedimiento.....	76
II.10.2. Evaluación del índice de actividad antibacteriana	80
II.10.3. Modelización matemática de las curvas de crecimiento, muerte bacteriana y efecto antibacteriano	80
II.10.4. Análisis estadístico	83
II.11. Evaluación de citotoxicidad del AE de <i>M. armillaris</i> sobre PMNs	83
II.11.1. Separación de PMNs de sangre bovina	83
II.11.2. Conteo y evaluación de la viabilidad celular	84
II.11.3. Exposición de los PMNs al AE de <i>M. armillaris</i>	85
III. RESULTADOS	87
III.1. Extracción del AE de <i>M. armillaris</i>	87
III.2. Caracterización del AE de <i>M. armillaris</i> obtenido	88
III.3. Selección de cepas y aislamientos	90

III.4. Determinación de la CIM y CBM <i>in vitro</i> de cloxacilina, rifaximina, eritromicina y del AE frente a <i>S. aureus</i> a pH 7.4, 6.5 y 5.	92
III.4.1. CIM y CBM del AE de <i>M. armillaris</i>	93
III.4.2. CIM y CBM de cloxacilina	94
III.4.3. CIM y CBM de rifaximina	95
III.4.4. CIM y CBM de eritromicina	97
III.5. Determinación de la CIM <i>in vitro</i> de la combinación de los diferentes antimicrobianos con el AE frente a <i>S. aureus</i> a pH 7.4; 6.5 y 5.	98
III.5.1. Combinaciones AE y cloxacilina.....	98
III.5.2. Combinaciones AE y rifaximina	99
III.5.3. Combinaciones AE y eritromicina	99
III.6. Ensayo de curva de muerte bacteriana	105
III.6.1. Aceite esencial	106
III.6.2. Cloxacilina y combinaciones con AE	118
III.6.3. Rifaximina y combinaciones con AE	136
III.6.4. Eritromicina y combinaciones con AE.....	151
III.6.5. Evaluación del índice de actividad antibacteriana E y su modelización matemática	176
III.7. Evaluación de la citotoxicidad del AE de <i>M. armillaris</i> sobre PMNs.....	206
IV. DISCUSIÓN	208
IV.1. Obtención y caracterización del AE de <i>M. armillaris</i>	208
IV.2. Actividad antimicrobiana del AE de <i>M. armillaris</i> frente a <i>S. aureus</i>	210
IV.3. Actividad antimicrobiana de cloxacilina y de su combinación con AE de <i>M. armillaris</i> frente a <i>S. aureus</i>	218
IV.3.1. Cloxacilina	218
IV.3.2. Combinación AE/Cloxacilina	221
IV.4. Actividad antimicrobiana de rifaximina y su combinación con AE de <i>M. armillaris</i> frente a <i>S. aureus</i>	226
IV.4.1. Rifaximina.....	226
IV.4.2. Combinación AE/rifaximina	229
IV.5. Actividad antimicrobiana de eritromicina y su combinación con AE de <i>M. armillaris</i> frente a <i>S. aureus</i>	232
IV.5.1. Eritromicina	232

IV.5.2. Combinación AE/eritromicina.....	236
IV.6. Evaluación de la viabilidad celular de PMNs frente al AE de <i>M. armillaris</i>	240
V. CONCLUSIONES.....	242
VI. BIBLIOGRAFÍA	244

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Solventes y diluyentes empleados para la preparación de las soluciones stock de cloxacilina, eritromicina y rifaximina.

Tabla 2. Concentraciones de rifaximina, eritromicina y cloxacilina utilizadas para realizar el tablero de damas frente a cepas y aislamientos sensibles y resistentes.

Tabla 3. Composición porcentual del AE de *M. armillaris* obtenido en Julio 2015 y en Julio 2017.

Tabla 4. Resultado de CIM del AE a pH 7.4; 6.5 Y 5.0.

Tabla 5. Resultado de CBM del AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 6. Resultado de CIM de cloxacilina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 7. Resultado de CBM de cloxacilina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 8. Resultado de CIM de rifaximina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 9. Resultado de CBM de rifaximina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 10. Resultado de CIM de eritromicina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 11. Resultado de CBM de eritromicina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 12. Resultado de prueba de sinergismo de combinaciones AE/cloxacilina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 13. Combinaciones AE/cloxacilina elegidas para ensayo de curva de muerte bacteriana.

Tabla 14. Resultado de prueba de sinergismo de combinaciones AE/rifaximina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 15. Combinaciones AE/rifaximina elegidas para ensayo de curva de muerte bacteriana.

Tabla 16. Resultado de prueba de sinergismo de combinaciones AE/eritromicina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 17. Combinaciones AE/eritromicina elegidas para el ensayo de curva de muerte bacteriana.

Tabla 18. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 frente al AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 19. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para las cepas salvajes frente al AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 20. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para la cepa ATCC 29213 frente al AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 21. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para las cepas salvajes frente al AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 22. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina.

Tabla 23. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina.

Tabla 24. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina.

Tabla 25. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina.

Tabla 26. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina/AE.

Tabla 27. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina/AE.

Tabla 28. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina/AE.

Tabla 29. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina/AE.

Tabla 30. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina.

Tabla 31. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina.

Tabla 32. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina.

Tabla 33. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina

Tabla 34. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina/AE.

Tabla 35. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina/AE.

Tabla 36. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina/AE.

Tabla 37. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina/AE.

Tabla 38. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Tabla 39. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para los aislamientos salvajes sensibles (SA13-SA96-SA139) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Tabla 40. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para los aislamientos salvajes resistentes (SA78A-SA79A-SA86B) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Tabla 41. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Tabla 42. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para los aislamientos salvajes sensibles (SA13-SA96-SA139) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Tabla 43. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para los aislamientos salvajes resistentes (SA78A-SA79A-SA86B) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Tabla 44. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina/AE.

Tabla 45. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para los aislamientos salvajes sensibles (SA13-SA96-SA139) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina/AE.

Tabla 46. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para los aislamientos salvajes resistentes (SA78A-SA79A-SA86B) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina/AE.

Tabla 47. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina/AE.

Tabla 48. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para los aislamientos salvajes sensibles (SA13-SA96-SA139) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina/AE.

Tabla 49. Parámetros estimados por el modelo Sigmoidal para los aislamientos salvajes resistentes (SA78A-SA79A-SA86B) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina/AE.

Tabla 50. Parámetros estimados por aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana del AE frente a *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Tabla 51. Parámetros estimados por aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina.

Tabla 52. Parámetros estimados por aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina en presencia de AE.

Tabla 53. Parámetros estimados por aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina.

Tabla 54. Parámetros estimados por aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina en presencia de AE.

Tabla 55. Parámetros estimados por aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Tabla 56. Parámetros estimados por aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina en presencia de AE.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una sección vertical de un pezón bovino (adaptado de Hibbitt y col., 1992). Del lado izquierdo se esquematizan los factores que protegen el pezón contra el trauma mecánico durante la succión o el ordeño, y a la derecha se presentan los mecanismos de defensa contra la infección ascendente por bacterias desde la superficie de la piel ingresando a través del canal del pezón. PMNs: polimorfonucleares; FQN: Factor quimiotáctico de neutrófilos.

Figura 2. *S. aureus* con tinción de Gram y crecimiento en agar sangre.

Figura 3. Formas de destilación de arrastre de vapor de agua: Generación de vapor externa (A), generación de vapor *in situ* (B), calentamiento de material vegetal sumergido (C).

Figura 4. Planta de *M. armillaris*. (Fuente: Manzaner Molina, 2005).

Figura 5. Inflorescencias de *M. armillaris*. (Fuente: Manzaner Molina 2005).

Figura 6. Equipo de destilación tipo Clevenger para la determinación de AEs en drogas vegetales. Las dimensiones son mm. (Fuente: FA VII Ed., 2013).

Figura 7. Esquematación de policubetas para la realización de las CIMs de los antimicrobianos por microdilución. *C+*: control positivo, *C-*: control negativo.

Figura 8. Esquema de armado del tablero de damas.

Figura 9. Equipo Clevenger para determinar el rendimiento de extracción de *M. armillaris*.

Figura 10. Equipo de destilación con producción de vapor *in situ* usado en la extracción del AE de *M. armillaris* (A). AE obtenido en el proceso (B) y su separación (C).

Figura 11. Cromatograma obtenido por cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas del AE de *M. armillaris* julio 2015.

Figura 12. Aislamientos β -hemolíticos obtenidos.

Figura 13. Resultados de prueba de antibiograma por difusión en placa.

Figura 14. Placa de microtitulación para determinación de CIM.

Figura 15. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a la cepa de referencia ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 16. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 17. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 18. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 19. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 20. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SA78A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 21. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SA79A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 22. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SA86B a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 23. Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 24. Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 25. Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 26. Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 27. Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 28. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y cloxacilina (AE-CLOX) frente a la cepa ATCC29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 29. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 30. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 31. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 32. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 33. Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 34. Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 35. Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 36. Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 37. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y rifaximina (AE-RIF) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 38. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y rifaximina (AE-RIF) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 39. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y rifaximina (AE-RIF) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 40. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y rifaximina (AE-RIF) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 41. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 42. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 43. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 44. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 45. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA78A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 46. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA79A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 47. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA86B a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 48. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 49. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 50. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 51. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 52. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA78A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 53. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA79A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 54. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA86B a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Figura 55. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) del AE de *M. armillaris* a pH 7.4, 6.5, y 5.0. frente a *S. aureus* ATCC 29213 (A); promedio de cepas SA13, SA96, SA139, SARM5-I (B); promedio de cepas SA78A, SA79A, SA86B (C).

Figura 56. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de cloxacilina (CLOX) frente a *S. aureus* ATCC 29213 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 57. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de cloxacilina (CLOX) frente a SA13 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 58. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de cloxacilina (CLOX) frente a SA96 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 59. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de cloxacilina (CLOX) frente a SA139 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 60. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de cloxacilina (CLOX) frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 61. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de rifaximina (RIF) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 62. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de rifaximina (RIF) frente a SA13 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 63. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de rifaximina (RIF) frente a SA96 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 64. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de rifaximina (RIF) frente a SA139 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 65. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de eritromicina (ERI) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 66. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de eritromicina (ERI) frente a SA13 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 67. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de eritromicina (ERI) frente a SA96 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 68. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de eritromicina (ERI) frente a SA139 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 69. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de eritromicina (ERI) frente a SA78A a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 70. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de eritromicina (ERI) frente a SA79A a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 71. Representación gráfica del efecto antibacteriano (*E*: $\Delta\text{Log UFC/mL}$ 24 – 0 h) de eritromicina (ERI) frente a SA86B a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Figura 72. PMNs obtenidos de sangre bovina. A: Tinción de May-Grundawald Giemsa; B: Recuento de células viables en cámara de Neubauer con azul tripán.

Figura 73. Recuento celular (PMNs/mL) luego de 8 horas de exposición a distintas concentraciones de AE, utilizando un control de DMSO 2.5%.

Figura 74. Estructura molecular de la cloxacilina.

Figura 75. Estructura molecular de la rifaximina.

Figura 76. Estructura molecular de la eritromicina.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A. Antagonismo

ADN. Ácido desoxirribonucleico

AE. Aceite esencial

AMH. Agar Mueller Hinton

ARN. Ácido ribonucleico

ATCC. Acrónimo inglés de colección de cultivos tipo americana

C_{50} . Concentración que causa el 50% de la reducción de E_{max} ,

CBM. Concentración bactericida mínima

CFI. Coeficiente fraccionario inhibitorio

CIM. Concentración inhibitoria mínima

CLOX. Cloxacilina

CLSI. Acrónimo del Instituto de Estandarización de Procedimientos de Laboratorios Clínicos de E.E.U.U. (ex NCCLS)

CMH. Caldo Mueller Hinton

DMSO. Dimetilsulfóxido

E. Índice de actividad antibacteriana

E_0 . Índice E en ausencia de antimicrobiano

E_{max} . Máxima reducción en Log_{10} del E_0

ERI. Eritromicina

FID. Acrónimo inglés de detector de ionización de llama

FQN. Factor quimiotáctico de neutrófilos.

g. Gramo

g. Unidad de fuerza centrífuga relativa

GC. Acrónimo inglés de cromatografía gaseosa

h. Horas

HPLC. Acrónimo inglés de cromatografía líquida de alta resolución

I. Indiferencia

Kg. Kilogramo

LPAG. Denominación del herbario de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP

LEFyT. Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos de la Cátedra de Farmacología de la facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata.

Log₁₀. Logaritmo en base 10

LPD. Acrónimo inglés de duración de período de latencia

M. Concentración molar

min. Minutos

mL. Mililitro

mm. Milímetro

MPD. Acrónimo inglés de máxima densidad poblacional

N. Concentración normal

N₀. Concentración del inóculo inicial

N_{max}. Máxima caída de recuento bacteriano

°C. Grados centígrados

OMS. Acrónimo de la Organización Mundial de la Salud

PBP. Acrónimo inglés de proteína de unión a penicilinas

PCR. Acrónimo inglés de reacción en cadena de la polimerasa

pH. Logaritmo de la inversa de la concentración de hidrogeniones

PMNs. Células polimorfonucleares

R. Coeficiente de correlación

RIF. Rifaximina

RPMI. Siglas del medio de cultivo "Roswell Park Memorial Institute"

s. Segundos

S. Sinergismo

S. aureus contracción de *Staphylococcus aureus*

SARM. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

SP. Sinergismo parcial.

T₁₅₀. Tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima

t₀: tiempo de inicio del ensayo (0 horas)

t₂₄: tiempo de la finalización del ensayo (24 horas)

UI. Unidades internacionales

UFC. Unidades formadoras de colonias

UFC/mL. Unidades formadoras de colonias por mililitro

μ. Velocidad de crecimiento específica

μg. Microgramo

μL. Microlitro

Υ. Coeficiente de sigmoidicidad

>. Mayor que

<. Menor que

±. Más o menos

≤. Menor o igual que

≥. Mayor o igual que

%. Porcentaje

% v/v. Concentración volumen en volumen

Títulos y Resúmenes

Título: Evaluación de combinaciones antimicrobianas/aceite esencial de *Melaleuca armillaris* Sm. como alternativas terapéuticas para el tratamiento de mastitis bovina por *Staphylococcus aureus*

Palabras claves: Mastitis, aceite esencial, *Melaleuca armillaris*, *Staphylococcus aureus*, Resistencia, Antimicrobianos, Sinergismo.

Resumen

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue evaluar la capacidad del aceite esencial (AE) de *Melaleuca armillaris* de actuar como coadyuvante de antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina por *Staphylococcus aureus*, en busca de una alternativa más eficaz frente a infecciones de difícil resolución. El AE fue obtenido de plantas cultivadas en la provincia de Buenos Aires. Se caracterizó fisicoquímicamente para establecer parámetros de calidad, presentando 1.8 cineol (72.3%), limoneno (7.8%) y α -pineno (6%) como componentes principales. Se determinaron las Concentraciones Inhibitoria y Bactericida Mínimas (CIM y CBM) del AE y de cloxacilina, eritromicina y rifaximina, frente a *S. aureus* a diferentes pHs (7.4; 6.5 y 5.0), emulando condiciones extra e intracelulares. Utilizamos cepas sensibles a los 3 antimicrobianos, resistentes a eritromicina, una cepa meticilino resistente (SARM) y *S. aureus* ATCC 29213 como control. El sinergismo entre el AE y los antimicrobianos se estimó por el índice de Concentración Fraccionaria Inhibitoria (CFI) y mediante modelado matemático de la cinética de muerte bacteriana. El AE demostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, la que mejoró al disminuir el pH. Se observó sinergismo al combinarlo con cloxacilina o rifaximina, que se vio favorecido en condiciones ácidas, de manera particularmente importante para cloxacilina frente a la cepa SARM. La combinación AE/eritromicina presentó sinergismo parcial. El AE afectó la

viabilidad de los polimorfonucleares (PMNs) a bajas concentraciones, por lo que no se pudo evaluar su actividad a nivel intracelular.

El AE de *M. armillaris* es un interesante coadyuvante de los antimicrobianos. Estos hallazgos lo convierten en una herramienta natural e innovadora para el desarrollo de nuevas formulaciones alternativas a los antibióticos convencionales para el control de mastitis bovinas estafilocócicas. Sin embargo, se debe avanzar en la evaluación de su citotoxicidad sobre PMNs y estrategias para disminuirla.

Title: Evaluation of antimicrobial / essential oil combinations of *Melaleuca armillaris* Sm. as therapeutic alternative for the treatment of bovine mastitis by *Staphylococcus aureus*

Key words: Mastitis, Essential oil, *Melaleuca armillaris*, *Staphylococcus aureus*, Resistance, Antimicrobials, Synergism.

Summary

The main objective of this Doctoral Thesis was to evaluate the essential oil (EO) of *Melaleuca armillaris* as an adjuvant of antimicrobials commonly used in the treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, in search of a more effective alternative against difficult resolution infections. EO was obtained from plants grown in the province of Buenos Aires. It was characterized physicochemically to establish quality parameters; 1.8 cineole (72.3%), limonene (7.8%) and α -pinene (6%) were the main components. The Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC and MBC) of EO, cloxacillin, erythromycin and rifaximin, were established against *S. aureus* at different pHs (7.4, 6.5 and 5.0), emulating extra and intracellular conditions. We used strains sensitive to the 3 antimicrobials, 3 resistant to erythromycin, a methicillin resistant strain (MRSA) and *S. aureus* ATCC 29213 as control. The synergism between EO and antimicrobials was estimated by the Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC) and by mathematical modeling of the bacterial killing kinetics. EO demonstrated antimicrobial activity against *S. aureus*, which was improved when the pH decreased. Synergism was observed in combinations with cloxacillin or rifaximin, which was favored under acidic conditions, it was particularly important for cloxacillin against the MRSA strain. The EO/erythromycin combination showed partial synergism. EO affected the viability of polymorphonuclear cells (PMNs) at low concentrations, so its activity at the intracellular level could not be evaluated. *M. armillaris* EO is an interesting adjuvant to antimicrobials. These findings make it a natural and innovative tool for the development of new alternative

formulations to conventional antibiotics for the control of staphylococcal bovine mastitis. Nevertheless, progress must be made in evaluating its cytotoxicity on PMNs and strategies to reduce it.

I. INTRODUCCIÓN

El tratamiento con antibióticos es una de las terapias más importante utilizada en la lucha contra las enfermedades infecciosas, la que ha mejorado sustancialmente la calidad de vida y los aspectos sanitarios desde su introducción. Sin embargo, a pesar de los avances científicos, vivimos aún y cada vez más, en una época donde los casos de infecciones resistentes a los antibióticos aumentan en forma alarmante debido al riesgo constante de propagación de microorganismos resistentes (OMS, 2018a). Se estima que para el año 2050 será la causa de 10 millones de muertes por año (O'Neil, 2014). El factor más importante que influye en la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos es la excesiva exposición de las bacterias a los mismos (Canton y Morosini, 2011). El uso indiscriminado de estos agentes genera una presión selectiva, permitiendo que prosperen cepas con el genotipo más apto. A pesar del hecho de que la evolución es inevitable, el uso intensivo de los agentes antimicrobianos en la población, en los hospitales, en la ganadería y en la agricultura es sin duda el principal responsable de alimentar esta crisis. Las bacterias no sólo pueden desarrollar resistencia a un solo agente químico, muy por el contrario, la resistencia se puede extender a muchos fármacos y propagarse en la comunidad debido al uso inadecuado de antibióticos (Canton y Morosini, 2011; Neu, 1992).

La mastitis bovina es una patología que comúnmente afecta a bovinos productores de leche, siendo una enfermedad contagiosa que tiene gran impacto sobre la rentabilidad del sector (Ruegg, 2017). Los animales enfermos deben ser tratados adecuadamente para garantizar tanto su bienestar como su capacidad de producir leche de calidad (Krömker y Leimbach, 2017). Sin embargo, el uso de antimicrobianos puede presentar desventajas como tasas de curación parcialmente bajas y presencia de residuos en leche que podrían favorecer la aparición de microorganismos resistentes. Esto implica que existe una necesidad concreta de realizar estudios para encontrar tratamientos alternativos (Gomes y

Henriques, 2016). Estos posibles tratamientos innovadores y alternativos pueden incluir la disminución del uso de antimicrobianos reemplazándolos por manejos más efectivos y seguros o sustituyendo su aplicación con otro tipo de compuestos (Krömker y Leimbach, 2017).

El rápido desarrollo de la biología molecular ha arrojado luz sobre un enfoque más eficiente para el descubrimiento de nuevas sustancias con acción antibiótica. Sin embargo, el resultado desalentador es que, en la actualidad, ningún antibiótico encontrado por esta estrategia aún ha alcanzado entornos clínicos. Esto es debido a que se ha colocado demasiado énfasis en la identificación de objetivos y las moléculas que interactúan, mientras que muy poco se ha puesto en la capacidad real de estas moléculas para permear la pared celular bacteriana, evadir el flujo de salida y evitar la resistencia mutacional (Livermore, 2011). Por lo tanto, el descubrimiento de un compuesto que se una a una diana conservada no necesariamente equivale a encontrar un compuesto con actividad antibiótica. Por otra parte, los antibióticos con un solo objetivo diana son especialmente vulnerables a la resistencia bacteriana mutacional (Yap y col., 2014).

Muchas investigaciones intentan estudiar el potencial de los extractos de plantas y algunos compuestos activos como eficaces combatientes de los problemas de antibiótico resistencia bacteriana. Los extractos de plantas, que constan de mezclas complejas de los principales compuestos y sus metabolitos secundarios, junto con los antibióticos convencionales pueden presentar efectos sinérgicos. Podemos mencionar varias ventajas de la utilización de productos naturales como compuestos antimicrobianos, tales como menos efectos adversos, mejor tolerancia del paciente, relativo bajo costo, amplia aceptación debido a sus aplicaciones tradicionales, renovabilidad y mejor biodegradabilidad (Yap y col., 2014).

Muy pocos trabajos han dado una idea de la prevalencia de la resistencia a la exposición a extractos naturales, en particular con respecto a los aceites esenciales (AEs). Estos se componen por una mezcla de múltiples compuestos, la cual ejerce una mayor actividad antibacteriana en comparación con los principales

componentes solos. También se ha postulado que la función de los compuestos principales está regulada por otras moléculas menores que ayudan sinérgicamente en la potenciación del efecto. Puede haber varios objetivos diana en una célula que da lugar a la mejora en la actividad antibacteriana. Por lo tanto, es más significativo y racional estudiar todo el AE en lugar de algunos de sus componentes de manera aislada, basándose en el posible concepto de sinergia que realmente puede existir entre los componentes de los AEs. Se ha observado que algunas especies bacterianas no logran seleccionar resistencia a ciertos AEs luego de una larga exposición a los mismos. Hurdle y col. (2011) también sugirieron un bajo potencial para el desarrollo de resistencia en los agentes de membrana activa debido a los sistemas de modificación de lipopolisacáridos. Por otra parte, el cambio de las estructuras de la membrana y su composición detiene instantáneamente la viabilidad de las bacterias (Langeveld y col., 2014). Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión selectiva a la que se someten las bacterias. Como la aplicación de extractos vegetales implica el uso de múltiples compuestos a la vez, las bacterias presentarían dificultad para desarrollar mecanismos de resistencia contra cada uno de los compuestos de manera simultánea (Begun, 2005; Haddadin y col., 2002; Lowy, 2003; Sifri y col., 2006), por lo que entonces es posible que los extractos vegetales y AEs puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes y multirresistentes a agentes antimicrobianos de uso común.

Combinar agentes antimicrobianos convencionales y AEs es un concepto nuevo que proporciona un potencial prometedor y significativo para el desarrollo de nuevas terapias a aplicar para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos multi-resistentes. Es necesario profundizar los estudios sobre las bases moleculares de las interacciones sinérgicas, con el fin de comprender mejor el mecanismo por el que actúan en conjunto, punto fundamental para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

Se ha encontrado un efecto sinérgico potenciador de los AEs, los que a pesar de no producir efectos inhibidores significativos cuando son utilizados solos,

utilizados en combinación con fármacos convencionales, producen una actividad antimicrobiana mejorada ya que el efecto combinatorio supera su rendimiento individual (Gibbons y col., 2003). La actividad sinérgica ejercida por el uso de AEs ha demostrado la posibilidad de reducir la dosis mínima eficaz de los antibióticos en el tratamiento de infecciones bacterianas. Esto, por lo tanto, reduciría los efectos adversos de los antimicrobianos. Lo más importante de la asociación de antibióticos con AEs dirigidos a bacterias resistentes es que pueden tener diferentes mecanismos de acción, lo que puede dar lugar a nuevas opciones para superar los embates de la resistencia microbiana. Características que hacen que la explotación de los AEs en la prevención de la resistencia bacteriana sea muy prometedora, ya que se diferencian de muchos agentes antimicrobianos convencionales que sólo tienen un único sitio de destino.

Dependiendo de la composición del AE se pueden atribuir distintos mecanismos de acción, incluyendo la degradación de la pared celular (Gill y Holley, 2006), daño en la membrana citoplásmica y coagulación del citoplasma (Ultee y col., 2000; Ultee y col, 2002), daño de las proteínas de la membrana y aumento de la permeabilidad que conduce a la fuga del contenido celular (Juven y col., 1994; Lambert y col., 2001), disminución de la fuerza motriz protónica (Ultee y Smid, 2001), y reducción del potencial de membrana mediante el aumento de la misma (Burt, 2004). Estos aceites contienen amplias gamas de polifenoles y terpenoides, que poseen fuerte afinidad de unión a diferentes estructuras moleculares como las membranas, debido a su gran lipofilia, presentando un alto potencial para penetrar a través de las paredes celulares y desorganizarlas, conduciendo así a la fuga del contenido celular (Nazzaro y col., 2013). La actividad antimicrobiana de los AEs, sumado a su posible efecto potenciador sobre los agentes antimicrobianos, los convierten en extractos valiosos con potencial para atacar el problema de la resistencia microbiana a los fármacos actualmente utilizados (Yap y col., 2014).

Los AEs resultan ser extractos muy útiles obtenidos a partir de plantas. Su potencial como mejoradores de los fármacos actuales abre nuevas posibilidades

para introducir mejoras en la industria farmacéutica que permitan desarrollar nuevos medicamentos con mayor efectividad y posiblemente menores efectos secundarios. Existen aspectos que todavía deben ser abordados, tales como la estabilidad, la selectividad y la biodisponibilidad de estos productos naturales en el organismo.

La explotación de los AEs como una terapia de reemplazo representa “una nueva era de fitofármacos”. Tal vez, en el futuro, los AEs puedan progresar desde ser uno de los agentes curativos tradicionales para convertirse en una terapia ampliamente utilizada en el dominio médico moderno.

En este estudio se plantea el uso del AE de *Melaleuca armillaris* en combinación con distintos antibióticos para lograr el mejor resultado *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Este es un patógeno de importancia en salud animal y humana. La convivencia con animales portadores de estos microorganismos puede llevar a infecciones causadas por cepas que han incrementado su resistencia a antibióticos. Las infecciones e intoxicaciones alimentarias continúan representando graves problemas en salud pública. La incidencia de esta bacteria en bovinos productores de leche es elevada y representa una de las principales causas de desarrollo de mastitis ocasionando importantes pérdidas económica al sector. Entre los múltiples riesgos que presenta la leche con *Staphylococcus* podemos mencionar que algunas cepas de estos microorganismos pueden producir una enterotoxina capaz de causar en el hombre gastroenteritis agudas, también puede producirse transferencia e intercambio de determinantes genéticos de antibiótico-resistencia entre el sistema animal-hombre-ambiente y la frecuente presencia de residuos de antibióticos devenida del uso frecuente de estos agentes con fines profilácticos y terapéuticos. Producir leche de buena calidad no solamente importa por su impacto en la salud pública, sino que también es un factor que estabiliza el desarrollo socio-económico en áreas rurales, particularmente en los países en desarrollo (McDowell, 1981). En 2017 la producción mundial de leche fue de 823 millones de toneladas y se espera un

incremento de un 22% para el año 2027 en el volumen producido, en gran medida por la participación de países en desarrollo en el sector (FAO, 2018).

A lo dicho debemos agregar la capacidad de supervivencia a nivel intracelular que presenta el *S. aureus*. El tratamiento antibacteriano frente a microorganismos capaces de mantenerse y prosperar en el medio intracelular nos enfrenta a un reto de grandes proporciones, ya que las bacterias en este estado son especialmente refractarias a los mecanismos inmunes. La pobre acción de los antimicrobianos a nivel intracelular posibilita la supervivencia de los microorganismos y predispone el camino para la selección de cepas resistentes. Estas consideraciones nos incitan a desarrollar el conocimiento con miras hacia el control de infecciones intracelulares, para lo cual los AEs podrían tener importante aplicación por su lipofilia y capacidad de permeabilizar las membranas celulares.

La obtención de resultados exitosos permitiría avanzar en un futuro sobre modelos *in vivo* y considerar la combinación AE/antibiótico como alternativa al tratamiento de infecciones estafilocócicas en bovinos productores de leche.

I.1. Mastitis bovina

La mastitis bovina es una enfermedad que afecta a los animales de producción lechera, ocasionando importantes pérdidas económicas. Estas pérdidas se producen por múltiples factores: descarte de leche anormal proveniente de cuartos clínicamente infectados y como resultado de la terapia con antibióticos, costos de reemplazo de vacas sacrificadas, mano de obra adicional para manejar vacas mastíticas, antibióticos y otros costos de tratamiento, servicios veterinarios y, lo más importante, reducción de la producción de leche en vacas infectadas subclínicamente, lo que contribuye a dos tercios de las pérdidas por mastitis (Mestorino y Errecalde, 2012). De hecho, un solo cuarto infectado durante la lactancia puede reducir la producción de leche de una vaca en un 10 a 12% (Akers y Nickerson, 2011).

La mastitis causa alteraciones que afectan directamente a las propiedades de la leche a través de cambios en la calidad técnica e higiénica de la misma, lo que

resulta en un procesamiento menos eficiente, dando como resultado sub-productos lácteos con propiedades menos favorables. Cuando se utiliza leche mastítica para la fabricación de productos alimenticios, se pueden encontrar por ejemplo mayores tiempos de coagulación con menores rendimientos en la elaboración de quesos, mayores tiempos de batido en la elaboración de manteca, alteración de la estabilidad térmica y menor vida útil de la leche en polvo, variación de las propiedades organolépticas de muchos subproductos entre otras tantas alteraciones de los mismos (Auldist, 2011).

En cuanto a los cambios que tienen lugar en la composición de la leche debido a una infección intramamaria podemos mencionar resumidamente, una disminución en el contenido de lactosa, grasa y caseína y, por otro lado, un aumento en las proteínas del suero, cloruro, sodio y el pH de esta (Wolter y col., 2004). Estas alteraciones se atribuyen a cambios en la permeabilidad vascular debido al proceso inflamatorio y al daño de las células responsables de la síntesis de los componentes de la leche, así como a cambios en la acción enzimática de las células somáticas o microorganismos en la glándula mamaria infectada (Kitchen, 1981).

Los pezones de las glándulas mamarias bovinas constituyen la primera línea de defensa contra la penetración de bacterias en la ubre. Normalmente, el músculo del esfínter cierra el canal del pezón cuando la vaca no está siendo ordeñada. Las infecciones comienzan cuando los microorganismos ingresan a través del canal del pezón y se multiplican en los tejidos productores de leche. Durante el ordeño mecánico, los microorganismos presentes en la leche o en el extremo del pezón pueden ser impulsados hacia o a través del conducto hacia la cisterna (Figura 1). Después del ordeño, el canal del pezón permanece dilatado durante una o dos horas. Los microorganismos que se encuentran en el medio ambiente o los que se presentan en la piel lastimada en la punta del pezón pueden invadir fácilmente un canal abierto. Las bacterias pueden pasar a la ubre adhiriéndose y colonizando los tejidos circundantes. Una vez que las bacterias están dentro de la ubre, comienzan la infección y la inflamación del área dañada. Inicialmente las bacterias afectan los

tejidos que recubren los grandes conductos y cisternas de recolección de leche mediante la producción de varios factores de virulencia que causan hinchazón y muerte de las células productoras de leche. Las células secretoras dañadas liberan sustancias que conducen a una mayor permeabilidad de los vasos y atraen leucocitos que pueden fagocitar y destruir bacterias. Durante este proceso, los leucocitos, a su vez, liberan sustancias que provocan el reclutamiento de leucocitos adicionales desde la sangre a la leche. Si las bacterias no se destruyen, continúan multiplicándose y comienzan a invadir conductos más pequeños y áreas alveolares. Algunas veces los microorganismos se eliminan rápidamente y la infección se termina. En este caso, los conductos obstruidos se abren y la composición y producción de leche vuelven a la normalidad en varios días. Sin embargo, a medida que la infección persiste y los conductos permanecen obstruidos, la leche atrapada hace que las células secretoras vuelvan a un estado de reposo (no productor) y los alvéolos comienzan a retraerse (Bogni y col., 2011).

Las sustancias liberadas por los leucocitos conducen a la destrucción completa de las estructuras alveolares, que son reemplazadas por tejidos conectivos y cicatriciales. La destrucción del tejido secretor de la leche es, en efecto, la tercera línea de defensa de la vaca para controlar la infección. Por lo tanto, a medida que la enfermedad progresa, el número de células somáticas (glóbulos blancos y células epiteliales descamadas) en la leche se eleva y se asocia con una reducción permanente en el rendimiento de la leche (Bramley y col., 2003).

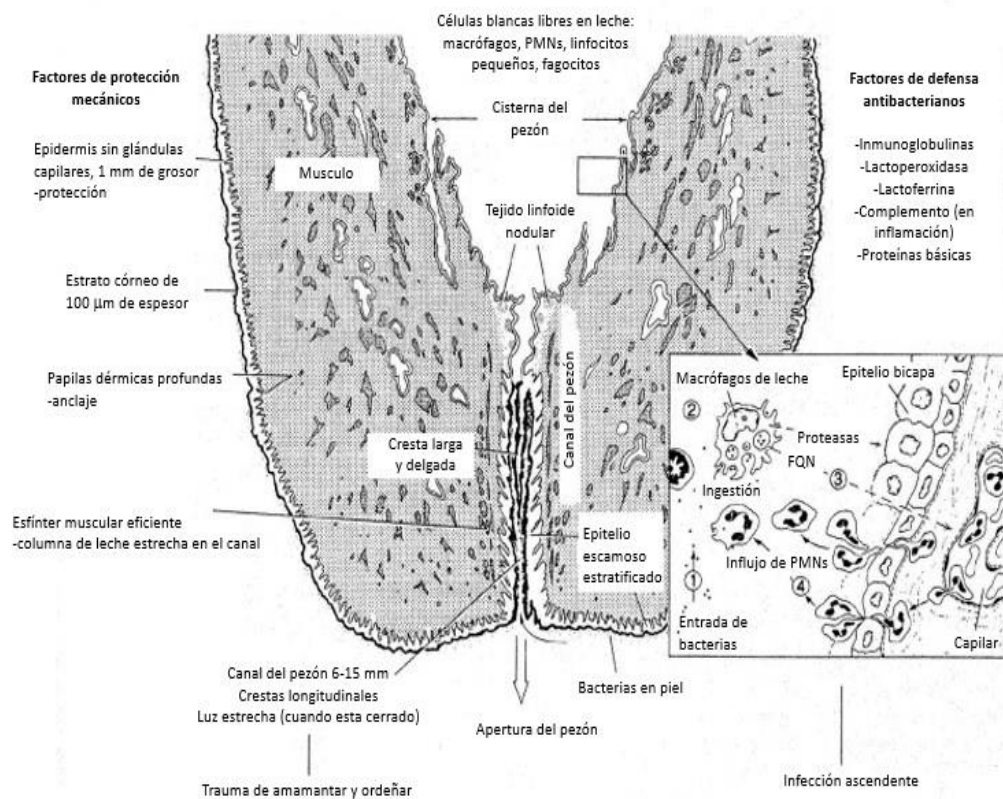


Figura 1. Esquema de una sección vertical de un pezón bovino (adaptado de Hibbitt y col., 1992). Del lado izquierdo se esquematizan los factores que protegen el pezón contra el trauma mecánico durante la succión o el ordeño, y a la derecha se presentan los mecanismos de defensa contra la infección ascendente por bacterias desde la superficie de la piel ingresando a través del canal del pezón. PMNs: polimorfonucleares; FQN: Factor quimiotáctico de neutrófilos.

Una infección intramamaria (con y sin signos clínicos) está asociada a un incremento en el recuento de células somáticas en leche, el cual varía según que microorganismos estén involucrados en la infección. En general, una mastitis se produce como respuesta a una infección bacteriana a nivel intramamario, sin embargo, también pueden ser ocasionadas por micoplasmas, hongos y algas. Entre los factores que generan una predisposición de la glándula mamaria a sufrir una infección encontramos a los traumas mecánicos, térmicos y a los daños químicos en el tejido. La aparición de mastitis depende de la interacción del huésped, el agente microbiano y los factores ambientales. La severidad con que se presenta la inflamación puede clasificarse en formas subclínicas, clínicas y crónicas, y su grado depende de la naturaleza del patógeno que la cause y de la

edad, la raza, la salud inmunológica y el estado de lactancia del animal. La mastitis subclínica es difícil de detectar debido a la ausencia de manifestaciones visibles, mientras que la mastitis clínica es una condición en la cual las anomalías de la ubre y de la secreción son fácilmente observables. Entre estos cambios en la leche podemos encontrar la aparición de coágulos y una apariencia acuosa como anomalías más obvias. También puede presentarse hinchazón y mayor sensibilidad en la ubre. Los síntomas sistémicos pueden incluir fiebre, pérdida de apetito, función reducida del rumen, debilidad y depresión. En el caso de la mastitis crónica la infección de la ubre se presenta por períodos prolongados y produce inflamación persistente de la glándula mamaria (Bramley y col., 2003).

Los microorganismos que causan mastitis generalmente se clasifican como contagiosos o ambientales según su reservorio primario y el modo de transmisión. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* son patógenos contagiosos y se transmiten comúnmente entre las vacas por contacto con leche infectada. Estos patógenos son de particular importancia porque causan principalmente formas subclínicas de infecciones intramamarias que a menudo son difíciles de detectar. Los patógenos ambientales primarios incluyen diferentes tipos de bacterias: especies de estreptococos (exceptuando a *Streptococcus agalactiae*), especies de coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) y especies de *Pseudomonas* (Bogni y col., 2011). Los principales patógenos (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*) son responsables de la mastitis clínica y subclínica, mientras que los coliformes y *Mycoplasmas* spp. generalmente causan mastitis clínica. Los patógenos menores se asocian con mayor frecuencia con una infección moderada en lugar de con signos clínicos. Estas infecciones se deben principalmente a *Corynebacterium bovis* o estafilococos con excepción de *S. aureus* (Bogni y col., 2011).

Los microorganismos que más comúnmente se aíslan en bovinos con mastitis son los estafilococos (Leitner y col., 2011) y particularmente el *S. aureus* tiene gran relevancia dentro de este género bacteriano en esta enfermedad (Oliveira y col.,

2007). Además de *S. aureus*, se ha encontrado que los estafilococos coagulasa negativos tienen gran relevancia en mastitis bovinas (Tremblay y col., 2013).

El género *Staphylococcus* incluye varias especies, divididas por la prueba de coagulasa en especies coagulasa-positivas y coagulasa-negativas. Algunos de ellos son parte de la flora microbiana normal de la piel y las membranas mucosas de los animales. *S. aureus* es el agente causante de mastitis más frecuente en muchas partes del mundo. Sin embargo, otros coagulasa-positivos, como *S. hyicus* y *S. intermedius*, también se reconocen como agentes etiológicos de la mastitis bovina (Bogni y col., 2011).

Dado que la mastitis bovina es una patología dolorosa para las vacas lecheras y representa la enfermedad contagiosa de mayor importancia económica en producción lechera, los animales enfermos deben ser tratados adecuadamente para garantizar su bienestar (Krömker y Leimbach, 2017). Sin embargo, las desventajas del uso de antimicrobianos incluyen tasas de curación parcialmente bajas y presencia de residuos en la leche, que podrían contribuir a la selección de microorganismos resistentes, demandando el estudio de nuevos tratamientos alternativos e innovadores (Gomes y Henriques, 2016). Además, estos residuos pueden ser peligrosos para los consumidores hipersensibles a los antimicrobianos y pueden interferir con los procesos de fabricación de derivados de la leche (Blowey y Edmondson, 2010). Por lo tanto, las estrategias para la reducción del uso de antimicrobianos en la producción lechera pueden dirigirse a la disminución de la incidencia de la enfermedad (nuevo control de infección) o la reducción de la terapia con antibióticos en animales enfermos, por omisión o sustitución (Krömker y Leimbach, 2017).

Los antimicrobianos en vacas lecheras generalmente se administran en terapia de secado o durante la lactancia. Principalmente, la mastitis clínica en vacas lactantes se trata con mayor frecuencia mediante la administración intramamaria de antibióticos (tratamiento local). En casos de mastitis grave, se administran antibióticos adicionales por vía parenteral (Gomes y Henriques, 2016; Oliveira y Ruegg, 2014). En cuanto a la implementación del tratamiento antibiótico local el

día del secado, aproximadamente 6 semanas antes del próximo parto, ha mostrado un progreso significativo en la reducción de la mastitis y ha permitido que muchos establecimientos lecheros reduzcan la proliferación de mastitis ocasionadas por microorganismos eliminando patógenos específicos de los animales infectados (Krömker y Leimbach, 2017).

Las mastitis causadas por bacterias coliformes como *E. coli* no requieren la administración local de antimicrobianos, ya que se observan altas tasas de autocuración y las tasas de curación o supervivencia no aumentan significativamente con el tratamiento con antibióticos, a menos que se detecten signos sistémicos de enfermedad clínica (Persson y col., 2015; Suojala y col., 2013). Si la mastitis es ocasionada por un microorganismo Gram-positivo se requiere tratamiento antibiótico local (Roberson, 2012).

Un fármaco ideal para el tratamiento de una mastitis debe tener una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) baja para los microorganismos patógenos causantes de la infección. Debido a que la terapia debe ser eficiente y dirigida a infecciones específicas, los antimicrobianos a utilizar serán diferentes si se está tratando contra microorganismos Gram-positivos o Gram-negativos. Los antimicrobianos para el tratamiento de mastitis deben ejercer preferentemente actividad bactericida. Esto es debido a que las células fagocíticas actúan normalmente después del ordeño, pero a medida que pasa el tiempo estas incorporan glóbulos de grasa “hinchándose”, lo cual disminuye su capacidad de fagocitar a los microorganismos. Como consecuencia, los fagocitos presentes en la leche son menos efectivos que aquellos provenientes de la sangre. Otra característica importante es que el antimicrobiano a utilizar no vea afectada su actividad por la interacción con la leche (Mestorino y Errecalde, 2012).

Además de tener una CIM baja frente a la mayoría de los patógenos que afectan a la ubre, un buen antimicrobiano para mastitis debería tener una alta biodisponibilidad tras su administración intramuscular, ser débilmente básico o no estar ionizado en suero, ser suficientemente liposoluble, tener un bajo grado de unión a proteínas, mantener la actividad antimicrobiana en secreciones

inflamatorias, y no acumularse en órganos específicos (Ziv, 1980). Las sulfonamidas, penicilinas, aminoglucósidos y cefalosporinas de primera generación administradas por vía sistémica no penetran fácilmente en la glándula mamaria. Los antibacterianos que son bases orgánicas débiles (macrólidos, trimetoprima) tienden a acumularse en la leche en la forma ionizada después de la administración parenteral y alcanzan mayores concentraciones que en la sangre. Por el contrario, las concentraciones en leche de aquellos que sean ácidos orgánicos (β -lactámicos, aminoglucósidos, sulfas) son mucho menores que las encontradas en la sangre. Los macrólidos (eritromicina, tilmicosina), trimetoprima, tetraciclinas y fluoroquinolonas se distribuyen bien en la glándula mamaria, aunque solo las fluoroquinolonas tienen un amplio espectro de actividad contra muchos patógenos Gram-negativos (Erskine y col, 2003). Sin embargo, el uso de las fluoroquinolonas debe limitarse a los casos sin alternativas de tratamiento o a los casos en que las alternativas posibles fallan debido a la resistencia antimicrobiana (Krömker y Leimbach, 2017).

I.2. Antimicrobianos

Los antimicrobianos son sustancias naturales (elaboradas por microorganismos) o sintéticas que en bajas concentraciones inhiben o destruyen a otros microorganismos. Aquellos que son semi-sintéticos se obtienen por modificaciones de la estructura química de agentes obtenidos naturalmente. Los distintos antimicrobianos presentan diferentes mecanismos de acción, cuyas dianas se encuentran en diferentes regiones de la célula bacteriana. Estas regiones son la pared celular, la membrana celular, los ribosomas (donde se lleva a cabo la síntesis proteica) y los ácidos nucleicos (Errecalde 2004; Mestorino y Marchetti, 2019).

Los antibióticos se clasifican según: su espectro de actividad (amplio o reducido), su estructura química, su efecto antimicrobiano (bactericida o bacteriostático), su mecanismo de acción y según su comportamiento farmacocinético/farmacodinámico. Cada grupo de antibióticos actúa

preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo. En general, son bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplasmática o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo de los ácidos nucleicos (ADN o ARN), y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos que son bactericidas rápidos (Calvo y Martínez, 2009; Mestorino y Marchetti, 2019).

Los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared necesitan para ejercer su acción que la bacteria se halle en crecimiento activo, y para su acción bactericida requieren que el medio en el que se encuentre la bacteria sea isotónico o hipotónico con respecto a su medio interno, lo que favorece el estallido celular cuando la pared celular se pierde o se desestructura. Suelen ser más activos sobre las bacterias Gram-positivas por su mayor riqueza en peptidoglicano. En general, son poco tóxicos por actuar selectivamente en una estructura que no está presente en las células eucariotas (Murray, 2008). A este grupo pertenecen los: β -lactámicos, glucopéptidos y bacitracina. Los agentes activos en la membrana celular bacteriana son las polimixinas. Estas sustancias son péptidos catiónicos con actividad de tipo detergente que disrumpen la porción fosfolipídica de la membrana de las bacterias Gram-negativas (Errecalde 2004; Mestorino y Marchetti, 2019).

La síntesis proteica es uno de los procesos que con mayor frecuencia se ve afectado por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. La mayoría de los antibióticos de este grupo tienen actividad bacteriostática, aunque los aminoglucósidos se comportan como bactericidas rápidos. La acción bactericida o bacteriostática también va a depender de las concentraciones del antimicrobiano, y del microorganismo afectado (Calvo y Martínez, 2009). Las tetraciclinas y los aminoglucósidos se unen al ribosoma en la

porción 30S, las primeras impiden la unión codón-anticodón, mientras que los aminoglucósidos ocasionan una lectura incorrecta que da lugar a la síntesis de una proteína anómala ocasionando la muerte bacteriana. Cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol, actúan a nivel de la porción 50S del ribosoma, inhibiendo la transpeptidasa, lo que impide que se formen los péptidos. Lincosamidas y macrólidos, también se unen a la porción 50S, inhibiendo la traslocación. Todos estos mecanismos, de una u otra manera, detienen o desvían la síntesis de proteínas.

Los agentes que actúan a nivel de los ácidos nucleicos son varios y sus sitios de acción diversos. Entre ellos tenemos a las sulfamidas y trimetoprima, cuya acción como antimetabolitos que impiden la síntesis de purinas los distingue del resto. Las fluoroquinolonas y novobiocina actúan a nivel de las cadenas de ADN, por inhibición de una topoisomerasa, la girasa de ADN, que es indispensable en la síntesis de este ácido nucleico. Los nitroimidazoles, como dimetridazol, metronidazol y tinidazol dan lugar a la disrupción de las cadenas de ADN, impidiendo su reparación. Los nitrofuranos, por su parte impiden la lectura codónica ADN-ARN mensajero (Errecalde 2004). Las rifamicinas (rifampicina y rifaximina) forman parte del grupo de las ansamicinas. Estas se unen a la subunidad β de la holoenzima ARN polimerasa de las bacterias inhibiendo los procesos de iniciación, elongación, y transcripción de la síntesis nucleica (Hartmann y col., 1967; Mestorino y Marchetti, 2019).

I.2.1. Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antibióticos se produce cuando un fármaco pierde su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Las bacterias se vuelven "resistentes" y continúan multiplicándose en presencia de niveles terapéuticos de los antibióticos. La exposición de los microorganismos a los agentes antimicrobianos tiende a favorecer naturalmente la selección de resistencia debido a la presión selectiva (Levy, 1993).

La base del desarrollo de la resistencia bacteriana está en la selección de cepas resistentes que producen ciertas concentraciones de antibiótico. El antibiótico no induce resistencia, solamente selecciona. Es una interferencia en el proceso de selección natural. Donde antes se seleccionaban las bacterias más aptas para la supervivencia, en el sitio del organismo de que se trate, en presencia del antibacteriano, sobrevivirán solamente aquellas variantes capaces de resistir a las concentraciones de antibiótico presentes en ese lugar. El antibiótico se convierte en el primer factor de selección (Errecalde, 2004).

Las bacterias pueden manifestar resistencia a los compuestos antibacterianos a través de una gran variedad de mecanismos. Algunas especies bacterianas son naturalmente resistentes a una clase de agentes antimicrobianos. En tales casos, todas las cepas de esa especie bacteriana son igualmente resistentes a todos los miembros de esa familia de antibióticos. Por otro lado, pueden generarse casos de resistencia adquirida, donde las poblaciones de bacterias inicialmente susceptibles se vuelven resistentes a un agente antibacteriano, proliferan y se diseminan bajo la presión selectiva por el uso de ese agente (Tenover, 2006).

La transmisibilidad de los factores de resistencia puede dar lugar a un problema aún mayor que es “la multiresistencia”. Estos microorganismos no solamente son resistentes a una serie de agentes antimicrobianos, sino que esa multiresistencia sigue siendo transferible, por lo que se transforman en reservorios de resistencia (Errecalde, 2004).

La disminución de la sensibilidad antimicrobiana es un problema continuo y en aumento. Se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo, no sólo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie. Entre estos mecanismos de resistencia tenemos:

- Producción de enzimas hidrolíticas: Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo. Se encuentran las β -

lactamasas que son enzimas que hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo β -lactámico. La producción de β -lactamasas es el mecanismo más frecuente de resistencia antibiótica. Se han identificado más de 1000 tipos de β -lactamasas producidas tanto por microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos (Rahman y col., 2018). Existen continuas mutaciones que producen expresión de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), manifestándose como resistencia a cefalosporinas de 3ra generación (ceftriaxona) y de 4ta generación (cefquinoma) (Mestorino y Marchetti, 2019). Para combatir esta resistencia se utiliza un inhibidor enzimático que tiene mayor afinidad por la enzima e impide la destrucción del antimicrobiano, permitiendo de esta manera su acción (clavulanato y sulbactam). Las BLEE se asocian a co-resistencia con aminoglucósidos y cotrimoxazol, dada la frecuencia de transferencia en el mismo plásmido (Moreno y col., 2009).

- Modificación del sitio activo: La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión del antimicrobiano. Se encuentra la modificación de la PBP (penicillin binding protein), la cual es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular de las bacterias, principalmente en Gram-positivas. Si se produce mutación del sitio de unión del antimicrobiano, por ejemplo, de los β -lactámicos, éstos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos. También está la modificación ribosomal; los genes *erm A* y *erm B* producen modificación del sitio activo del ribosoma, mediante metilación. Este mecanismo es importante en la resistencia a macrólidos en *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Moreno y col., 2009).

- Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano: Cambios en el diámetro y/o número de porinas donde

existe una disminución de la expresión de éstas, lo que disminuye la susceptibilidad a β -lactámicos y fluorquinolonas en *Pseudomonas*, ya que pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria (Moreno y col., 2009).

- Bombas de eflujo: Proteínas que transportan al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin poder ejercer la acción antimicrobiana. Existen bombas de eflujos multidrogas en la pared bacteriana que permiten la expulsión de sustancias como los antimicrobianos. Estos genes explican la resistencia a macrólidos y a fluoroquinolonas, entre otros. Para combatir este tipo de resistencia se encuentran en estudio la asociación de inhibidores de bombas de eflujo junto con el antimicrobiano (Marchetti y col., 2012; Moreno y col., 2009).

La evolución de los microorganismos y el uso indiscriminado de antimicrobianos ha llevado a la aparición de estos diversos mecanismos de resistencia a los mismos. Esto conlleva a la necesidad de encontrar nuevas moléculas alternativas con capacidad de inhibir el desarrollo de cepas bacterianas que afectan a la salud pública.

I.3. Mastitis por *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram-positivos (Figura 2), con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas (Cervantes-García y col., 2014). Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, y son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre), característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos (Kloss y col., 1992; Kuroda y col., 2001).

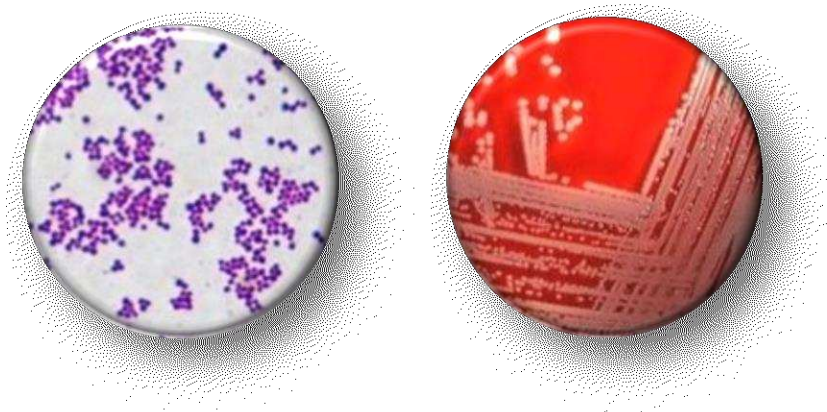


Figura 2. *S. aureus* con tinción de Gram y crecimiento en agar sangre.

La identificación de *S. aureus* se realiza con el empleo de la tinción de Gram y pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, coagulasa, fermentación de manitol, maltosa, trehalosa y producción de Voges-Proskauer. Complementariamente, se evalúa tipo de hemólisis. Con la prueba de la DNAsa termoestable se identifica fácilmente en el medio que contiene DNA y azul de toluidina. *S. aureus* también puede identificarse a través de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando genes específicos de especie. Sin embargo, estas técnicas son caras y laboriosas (Cervantes-García y col., 2014).

S. aureus es reconocido mundialmente como uno de los principales agentes causales de infecciones intramamarias en vacas lecheras. Este microorganismo puede expresar un amplio espectro de factores patogénicos utilizados para colonizar, invadir e infectar al huésped (Monistero y col., 2018).

S. aureus se puede encontrar en la piel de la glándula mamaria y en las lesiones del pezón, de manera que el principal reservorio son las ubres infectadas, donde los microorganismos se adaptan, sobreviven y crecen (Monistero y col., 2018). De este modo, la infección tiene lugar principalmente durante el ordeño, diseminándose de vaca en vaca, mediante las pezoneras, equipos de ordeño, los materiales de lavado, las manos de los operarios u otros objetos infectados (Zadoks y col., 2002).

Este microorganismo es capaz de crecer en el citoplasma celular, formar biofilms y originar bacteriemia persistente o infección crónica o permanecer quiescente y reactivarse meses o años más tarde. Por otro lado, si la densidad de población bacteriana en el foco infeccioso es elevada, *S. aureus* puede volverse resistente a la mayoría de los antibióticos empleados en monoterapia (Mensa y col., 2013).

La infección depende de los factores de virulencia producidos por este microorganismo, que puede expresar un amplio espectro de estos, secretándolos o manteniéndolos asociados a la superficie celular para promover la adhesión a los componentes de la matriz extracelular del huésped, dañar las células de éste y combatir su sistema inmunológico (Foster, 2005). Se ha propuesto que las enterotoxinas, desempeñarían un papel importante en el desarrollo de la mastitis, por ejemplo, creando un ambiente atractivo para la colonización (Piccinini y col., 2010), ya que se identifican con mayor frecuencia en *S. aureus* aislados de vacas con mastitis que en aislados de bovinos sanos (Piechota y col., 2014). De este modo, las enterotoxinas incidirían en la patogénesis de *S. aureus* comprometiendo la respuesta inmune de la glándula mamaria y la susceptibilidad a los antibióticos (El-Sayed y col., 2006).

Otro factor de virulencia importante producido por *S. aureus* es la enzima coagulasa, que reacciona con los productos inflamatorios, formando coágulos similares a la fibrina. Estos coágulos evitan el movimiento de los leucocitos y dificultan el accionar de los fagocitos del sistema inmunitario del huésped, también pueden evitar el drenaje de la leche de los conductos de la glándula mamaria y provocar daño en las células secretoras (Bramley y col., 1996).

S. aureus es capaz de sobrevivir en células alveolares, en neutrófilos y macrófagos de la glándula mamaria bovina durante largos periodos de tiempo (Hebert y col., 2000). Estos microorganismos, además, son capaces de multiplicarse en el interior de las vacuolas citoplasmáticas de la célula alveolar, usando como propio el citoesqueleto membranoso de la célula huésped. Pueden adoptar “formas L” que, al no poseer pared celular, resisten a los agentes

antibacterianos que actúan sobre los componentes de la pared bacteriana (Sears y col., 1987; Mercier y col., 2014). Por otra parte, tienen la capacidad de formar una cápsula de características lipoproteicas (proteína A) e hidrofóbicas que dificulta la fagocitosis y constituye el principal factor de infecciosidad y supervivencia en la ubre (Corbellini, 1996; Zandarín y col., 1996). Además, *S. aureus* forma un absceso rodeado de gruesas cápsulas fibrosas en la glándula mamaria. Esto puede evitar la llegada y acumulación adecuada de antibióticos en el sitio objetivo y, por lo tanto, se interrumpe la destrucción bacteriana (Basdew y Laing, 2011).

La capacidad de *S. aureus* de formar biofilms es otro factor importante que dificulta el control de las infecciones ocasionadas por el mismo, y puede ser una de las causas en la discrepancia entre la susceptibilidad antimicrobiana obtenida *in vitro* y la tasa de curación durante una infección intramamaria (Melchior y col., 2007). Un biofilm es una comunidad estructural de población bacteriana inmersa en una matriz polimérica producida por los mismos microorganismos. Esta matriz favorece la adhesión de la comunidad bacteriana y mejora la protección de su crecimiento. Los microorganismos capaces de formar biofilms inician la adhesión a una superficie para luego formar microcolonias que dan como resultado una estructura tridimensional de biofilm maduro (Prakash y col., 2003). Sus capacidades especiales para formar biofilms u ocultarse dentro de los fagocitos del huésped y las células epiteliales de la glándula mamaria podrían explicar su capacidad para evadir los antibióticos, lo que lleva a una terapia prolongada o incluso a la persistencia de la infección (Kamaruzzaman y col., 2017).

S. aureus es un patógeno de importancia en salud animal y humana. Las infecciones e intoxicaciones alimentarias continúan representando graves problemas en salud pública. Como mencionamos, la incidencia de esta bacteria en bovinos es elevada y el mayor peligro que tiene la leche con *Staphylococcus* reside en que algunas cepas de estos microorganismos pueden producir una enterotoxina termoestable capaz de causar en el hombre gastroenteritis agudas; además de favorecer la presencia de residuos de antibióticos y la transferencia e

intercambio de determinantes genéticos de antibiótico-resistencia entre el sistema animal-hombre-ambiente. Producir leche de buena calidad es importante por su impacto en la salud pública, la leche mastítica es nutricionalmente inferior a la leche normal y estéticamente inaceptable (Giesecke, 1983). La propagación de organismos zoonóticos, aunque es rara en presencia de técnicas modernas de procesamiento como la pasteurización, pero en el caso de productos lácteos no pasteurizados y o con fallas del proceso, representa una seria amenaza para la salud humana (Raza y col., 2013).

I.3.1. Tratamiento antimicrobiano de infecciones ocasionadas por *S. aureus* y sus mecanismos de resistencias

Los efectos de los fármacos antimicrobianos en el tratamiento de la mastitis dependen de su farmacocinética, su penetración en leche cuando se infunde por vía parenteral, la velocidad de absorción y distribución del fármaco cuando se administra por otras vías como la intramamaria. Estos caracteres están relacionados con la liposolubilidad, grado de ionización, capacidad de adhesión a proteínas séricas y de la glándula mamaria y el tipo de vehículo empleado en la formulación (Prescott y col., 2000). Las bases orgánicas débiles se acumulan en leche en su forma ionizada después de administrarse por vía parenteral, alcanzando concentraciones más altas que las presentes en la sangre. Por el contrario, las concentraciones de antimicrobianos ácidos débiles en la leche son inferiores que en la sangre. La farmacodinamia también es un aspecto importante y debe tenerse en cuenta, ya que los diferentes antibióticos presentan variaciones en sus mecanismos de acción y comportamiento farmacodinámico (Mestorino y Errecalde, 2012).

El tratamiento de una infección intramamaria producida por *S. aureus* puede ser complicado debido a que es un microorganismo patógeno muy versátil capaz de producir enfermedad por liberación de toxinas, invadir cualquier órgano o tejido y dar lugar a procesos de tipo purulento, necrosis tisular, sobrevivir y multiplicarse en el interior de células fagocíticas, formar microabscesos y producir

atrofia del tejido glandular alrededor del sitio infectado. Idealmente los antimicrobianos para tratar estas infecciones por *S. aureus* deben tener algunas características importantes: (1) penetración en las células fagocíticas y permanencia en las células durante un tiempo adecuado; (2) no ser metabolizados en las células; (3) tener una importante actividad antimicrobiana a pH ácido; (4) poder ser administrado a través del canal del pezón; y (5) presentar buena distribución en la glándula mamaria (Algharib y col., 2020).

Entre los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de mastitis bovina por *S. aureus* podemos encontrar: β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), macrólidos, rifamicinas, combinaciones de β -lactámicos con aminoglucósidos o con ácido clavulánico, entre otros (Prescott y col., 2000). En la actualidad existen en el mercado muchas variantes de productos para bovinos con estas moléculas, ya sea solas o combinadas.

La resistencia de los estafilococos a los antibióticos es uno de los problemas más frecuentes en la terapia, principalmente para *S. aureus* frente a la penicilina G (Olsen y col., 2006). Si bien al comienzo de la era antibiótica los estafilococos eran 100% sensibles a la penicilina, rápidamente desarrollaron resistencia. Esta se debe a la producción de β -lactamasas (penicilinasas) que desdoblan el anillo β -lactámico, inactivando el antibiótico por transformación en ácido penicilinoico inactivo. Este es el mecanismo de resistencia más frecuentemente observado en *S. aureus* aislado de bovinos con infecciones intramamarias en Argentina (Russi y col., 2015). En nuestro país, durante los últimos 20 años se han reportado aislamientos de *S. aureus* resistentes a penicilina en porcentajes variables que se ubican entre 14.3-48.4% (Gentilini y col. (2000) un 40.3%; Calvinho y col. (2002) un 47.6%; Russi y col. (2008) un 48.4%; Pellegrino y col. (2011) un 14.3% y; Neder y col. (2019) un 28.12%).

Existen β -lactámicos con actividad frente a cepas productoras de β -lactamasas: las penicilinas resistentes a penicilinasas (meticilina, nafcilina y penicilinas isoxazólicas), las asociaciones de una penicilina con un inhibidor de betalactamasas, las cefalosporinas (especialmente las de primera generación) y

los carbapenems. La nafcilina y las penicilinas isoxazólicas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina y flucloxacilina) son entre 4 y 8 veces más activas que metilina. De estas, la cloxacilina es frecuentemente utilizada en varios países, incluida la Argentina, para el tratamiento de la mastitis bovina (Neder y col., 2019). La resistencia a metilina suele ser cruzada con todos los antibióticos β -lactámicos disponibles. La causa de la resistencia a metilina es la adquisición del gen *mecA*, que codifica una PBP2 adicional denominada PBP2a. La PBP2a tiene escasa afinidad por el anillo β -lactámico y, en su presencia, sustituye a la PBP2 original en la función de transpeptidación para la síntesis de peptidoglucano. La PBP2 sigue participando en la transglucosilación (Mensa y col., 2013).

El *S. aureus* resistente a metilina (SARM), que originalmente estaba restringido a hospitales, se ha convertido en un patógeno significativo en la comunidad, aumentando considerablemente su importancia para la salud pública y la salud animal (Vandenesch y col., 2003). Aunque *S. aureus* es un microorganismo frecuente en la mastitis bovina, SARM no se asocia comúnmente con esta patología (Hendriksen y col., 2008). Sin embargo, existen reportes de aparición de éste en diferentes partes del mundo, incluyendo a Brasil (Guimarães y col., 2017) y Argentina (Srednika y col., 2019).

Los β -lactámicos mantienen su actividad a pH 5 (Barcia-Macay, 2006). De hecho, SARM puede recuperar parcialmente su sensibilidad a cloxacilina cuando crece en un medio a pH 5.5 como el observado en el interior de los fagolisosomas, donde suele alojarse el microorganismo. El pH ácido origina un cambio en la estructura tridimensional de la PBP2a que afecta a su centro catalítico y aumenta la afinidad por el β -lactámico. El resultado es la recuperación parcial de la sensibilidad que se traduce en un efecto bactericida de importancia variable según el β -lactámico, la concentración y el tiempo de exposición (Lemaire y col., 2008).

Los elementos genéticos móviles tienen un rol clave en la capacidad de selección de resistencia del *S. aureus* frente a la exposición a antibióticos. Así, la información genética se intercambia entre bacterias a través de la transferencia horizontal de genes. Las cepas de *S. aureus* en general contienen una variedad

relativamente grande de elementos móviles que juegan un papel importante en conferir resistencia a los antibióticos β -lactámicos (McGuinness y col., 2017).

El uso de rifaximina en vacas con mastitis ha sido aprobado por la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA) en Europa y es ampliamente utilizada en países como Italia, Francia, Polonia, Austria, Estonia, y en Israel. Por otro lado, este antibiótico también se está utilizando con el mismo propósito en América del Sur, principalmente en Argentina, Chile y Uruguay. Sin embargo, la información sobre su comportamiento farmacodinámico y farmacocinético es inexistente. Existen pocas publicaciones sobre su eficacia en el ganado lechero (Bertocchi y col., 2000; Pol y col., 2018). La rifaximina es una molécula análoga a la rifampicina y, en consecuencia, la resistencia a rifaximina en un microorganismo se puede comparar con la resistencia a la rifampicina (Pistiki y col., 2014). La resistencia a la rifampicina se produce principalmente por la alteración cromosómica de la ARN polimerasa dependiente de ADN, que es el objetivo diana de este antibiótico (Sprat, 1994). Se ha demostrado el rápido desarrollo de resistencia *in vitro* e *in vivo* a las rifamicinas cuando son empleadas como monodrogas (Gillespie, 2002). Por esta razón, por lo general, se combinan con otros compuestos antibióticos (Frieden y col., 2003), encontrándose en el mercado combinaciones de rifaximina con cefacetilo por ejemplo. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en 2014 realizó una clasificación de antimicrobianos según su importancia crítica en salud humana con respecto a su uso recomendado en salud animal. Aquellos ubicados en las categorías 1 y 2 pueden ser empleados en medicina veterinaria, mientras que los de categoría 3 están restringidos a medicina humana. En esta categorización, las rifamicinas fueron ubicadas en la primera categoría (EMA, 2014). Sin embargo, en 2018 la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó a estos antimicrobianos como críticamente importantes para uso humano al igual que macrólidos, aminopenicilinas con y sin inhibidores de betalactamasas, glicopéptidos y aminoglicósidos, entre otros (OMS, 2018b).

La eritromicina es un antibiótico del grupo de los macrólidos, y junto con la tilosina y espiramicina, es recomendada para el tratamiento de mastitis bovina causadas por cocos Gram-positivos (de los Santos y col., 2017). Recordemos que, al ser bases débiles, alcanzan altas concentraciones en leche tras la administración parenteral o intramamaria (Ziv, 1980). Como se mencionó anteriormente, pertenece al grupo de antimicrobianos clasificados como críticamente importantes. En Argentina, los reportes en general presentan un bajo porcentaje de aislamientos de *S. aureus* resistentes a eritromicina. Russi y col. (2008) informaron un 2.1% y Neder y col. (2019) un 3.12% de resistencia. Esto difiere de resultados obtenidos por Pellegrino y col. (2011), ya que obtuvieron un 35.5% de aislados resistentes. En Uruguay, de los Santos y col. (2017) monitorearon la resistencia a eritromicina frente a *S. aureus* entre los años 2008 y 2015, encontrando un 3.1% durante ese período. Si bien en general los porcentajes de resistencia obtenidos son bajos, es importante utilizar racionalmente esta molécula por su importancia para medicina humana.

I.4. Actividad intracelular de antimicrobianos

La capacidad de supervivencia intracelular del *S. aureus* es un factor que contribuye a la recurrencia de algunas infecciones como las mastitis. La falta general de éxito terapéutico frente a la mastitis suclínica causada por *S. aureus* requiere de una reevaluación de las estrategias implementadas para su tratamiento. A pesar de la disponibilidad de varios antibióticos con buena actividad *in vitro*, las tasas de curación son bajas, lo que sugiere que las bacterias no se estarían enfrentando a concentraciones adecuadas de antibióticos durante el tiempo necesario de contacto para que las terapias sean efectivas (Mestorino y Errecalde, 2012).

La capacidad de ingreso de un antimicrobiano al medio intracelular depende de factores físicos como el peso molecular, constante de disociación, liposolubilidad o unión a proteínas, y químicos como su estructura básica, grupos radicales, estereoisomería, movilidad electrónica, entre otros (Brown y Percival, 1978). Un

antimicrobiano puede ingresar al interior celular mediante diferentes mecanismos. Uno de ellos es la fagocitosis, la cual tiene lugar cuando los PMNs fagocitan a las bacterias. Otra de las formas de ingreso es mediante difusión pasiva, en la cual ingresan los antimicrobianos que a pH fisiológico se encuentran en forma electroquímica neutra y son lipofílicos. Un tercer mecanismo que podría estar implicado para ciertas moléculas es el transporte activo, por ejemplo, el ingreso de quinolonas se ve afectado por el uso de compuestos inhibidores energéticos, lo que sugiere que estos antimicrobianos pasan al espacio intracelular también por transporte activo además de la difusión pasiva que permite el paso mayoritario de las mismas (Nikaido y Thanassi, 1993; Moncada Cárdenas, 2017).

El fracaso terapéutico en estas infecciones parece estar relacionado con la baja penetración intracelular de los antibióticos de uso común o con su pérdida de actividad en condiciones de pH ácido dentro de los lisosomas. Otros factores que podrían influir incluyen: la baja difusión de antibióticos ácidos a través de la membrana lisosómica debido a su grado de ionización al pH neutro extracelular o citoplasmático, y también a la escasa retención, dentro de las células, de los antibióticos que ingresan libremente. Por todas estas razones, no se espera que la actividad sea muy duradera cuando los antibióticos se administran como soluciones acuosas. Es necesario que los antimicrobianos sean capaces de penetrar en gran medida a los fagocitos y ser retenidos en las células durante un período adecuado sin sufrir metabolismo dentro de las mismas, ser activos a pH bajo contra los estafilococos y que puedan administrarse mediante infusiones intramamarias (Gruet y col., 2001).

Como mencionamos, la falta de efectividad intracelular puede deberse a una penetración deficiente que causa concentraciones insuficientes de antibióticos dentro de los neutrófilos. Por ejemplo, los antimicrobianos que tienen una baja lipofilia, las moléculas cargadas y las moléculas que las proteínas transportadoras no reconocen en la membrana celular tienen menos capacidad de penetrar la membrana de los neutrófilos. Como resultado, la concentración intracelular podría no alcanzar la cantidad necesaria durante el tiempo óptimo frente al

microorganismo (Braga y col., 1998). Idealmente, para lograr alcanzar el entorno intracelular, el antimicrobiano debe ser lipofílico, no cargado a pH fisiológico o que sea reconocible para los transportadores de membrana. El ingreso a la célula y al fagolisosoma se puede mejorar mediante el uso de sistemas de nanopartículas (Abed y Couvreur, 2014). Por otro lado, aquellos fármacos que requieren un crecimiento activo de los microorganismos (como por ejemplo inhibidores de la pared celular) tendrán menor eficacia debido a la disminución de la velocidad de crecimiento de las bacterias en estas condiciones intracelulares (Van der Auwera y col., 1991). Otro factor influyente en la escasa actividad de ciertas moléculas a nivel intracelular puede ser que algunos antimicrobianos que llegan al espacio intracelular sean transportados nuevamente fuera de la célula mediante exocitosis (Kamaruzzaman y col., 2017) o por bombas de eflujo como la glicoproteína-p (Seral y col., 2003), aunque los granulocitos podrían tener una baja expresión de glicoproteína-p (Klimecki y col., 1994). Por último, como ya se ha mencionado es importante destacar que algunos antimicrobianos sufren inactivación al llegar al compartimento subcelular donde reside *S. aureus*, lo cual puede deberse a la inestabilidad de la molécula al pH ácido intrafagolisosomal. Este es el caso de los macrólidos como la eritromicina, los cuales tienen gran penetración intracelular, pero disminuyen su actividad antimicrobiana a pH 5.0 (Lucas y col., 2007; Moncada Cárdenas, 2017).

Ciertos antibióticos como los β -lactámicos y aminoglucósidos penetran pobremente en los PMNs debido a su alta polaridad y características hidrofílicas (Vaudaux y Waldvogel, 1979). Tanto las penicilinas como las cefalosporinas se acumulan de manera escasa en el interior de los fagocitos, aunque ello no significa que sean incapaces de atravesar la membrana plasmática (muchos compuestos tienen lipofilia suficiente para difundir a través de la bicapa lipídica), sino que son incapaces de quedar retenidos en el interior celular (Turnidge, 1998). Todos los β -lactámicos poseen en su estructura fundamental un grupo carboxílico libre, y por lo tanto se pueden considerar ácidos orgánicos. El pKa de este grupo se encuentra entre 3 y 5, por lo que cabe esperar que estas moléculas penetren, pero sean

excluidas del interior celular, al ser este más ácido que el medio extracelular (Delcour, 2009). Es decir, los β -lactámicos son capaces de penetrar en el interior de la célula, pero no son retenidos por ella. De hecho, un derivado básico de la bencilpenicilina, denominado dimetilaminopropil-bencilpenicilamida, cuyo grupo carboxílico está enmascarado por un radical básico, se acumula en el interior celular a una concentración de cuatro a cinco veces la extracelular (Renard y col., 1987).

En el caso de los aminoglucósidos, éstos se acumulan lentamente, pero de forma estable. La localización intracelular, aunque no homogénea, es mayoritariamente en los lisosomas, por lo que parece que la penetración de estos se produce por pinocitosis. Como los PMNs tienen una vida media muy corta, y además no poseen la capacidad de incluir sustancias por pinocitosis, es improbable que los aminoglucósidos se acumulen en su interior (Van den Broek, 1989). Sin embargo, Hand y King-Thompson (1986), hallaron que, aunque la acumulación de gentamicina en el interior de los PMNs era escasa, este aminoglucósido era capaz de disminuir el número de *S. aureus* fagocitados.

Las tetraciclinas parecen penetrar y acumularse moderadamente dentro de los neutrófilos. Estas ingresan en forma relativamente lenta, el 80% de su concentración intracelular final se alcanza después de 40 minutos (Laufen y Wildfeuer, 1989). Las tetraciclinas, como la tigeciclina, parecen estimular la producción de especies reactivas de oxígeno en los neutrófilos (Cockeran y col., 2012). Con respecto a los efectos antibacterianos intracelulares, Ong y col. (2005) evaluaron la actividad intracelular de la tigeciclina demostrando actividad bacteriostática frente a *S. aureus* a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los macrólidos tienen la capacidad de penetrar y acumularse en el interior de diferentes tipos celulares, incluyendo los neutrófilos. En los PMNs los valores de los cocientes intracelular/extracelular oscilan entre 20 para claritromicina, 30 para eritromicina y roxitromicina, 20 a 300/460 para azitromicina (Van Bambeke, 2014; Moncada Cárdenas, 2017). La penetración de macrólidos parece ser al menos parcialmente activa y requiere energía, mediada por el transportador de

nucleósidos y el intercambiador celular de sodio/calcio en la membrana celular de los neutrófilos (Vazifeh y col., 1998). Intracelularmente parecen estar asociados a los lisosomas en los macrófagos y a los gránulos azurófilos en los PMNs (Vazifeh y col., 1997). La actividad intracelular de la mayoría de los macrólidos es escasa (Van Bambeke, 2014), parece asociarse a la inactivación debida al pH ácido del fagolisosoma donde se localizan (Pemán y col., 1991). Sin embargo, los nuevos macrólidos como la azitromicina sí presentan actividad intracelular *in vivo* frente a *S. aureus* (Van Bambeke, 2014; Moncada Cárdenas, 2017).

Los antibióticos solubles en lípidos, como la rifampicina, probablemente penetran por difusión y se concentran en los PMNs. La clindamicina, también se concentra varias veces en el interior de los PMNs mediante transporte activo (Hand, 1988). La clindamicina parece ser transportada por el sistema de transporte de adenosina (Steinberg y Hand, 1984).

Yancey y col. (1991) enfrentaron diferentes antimicrobianos a PMNs que previamente habían fagocitado cepas de *S. aureus*. Encontraron que la penicilina G y la gentamicina, fueron inactivos en la eliminación de este microorganismo de las células. En cambio, la rifampicina y la ciprofloxacina fueron activas, siendo la rifampicina el compuesto más efectivo. Sanchez y col. (1988) hallaron que la rifampicina potencia su actividad con la acidez, esto sumado a su buena penetración intracelular, indudablemente contribuye a la excelente actividad de la rifampicina en los sistemas de ensayo de PMN-*S. aureus*. La eritromicina y la clindamicina, sin embargo, no fueron efectivas para matar a las bacterias a pesar de que estos compuestos estaban altamente concentrados dentro de los PMNs.

I.5. Fitoterapia en el tratamiento de la mastitis bovina.

Actualmente, la herramienta terapéutica disponible frente a la mastitis bovina continúa siendo la administración intramamaria de antibióticos. Sin embargo, su uso, como hemos mencionado, está asociado con el problema de la resistencia a los antimicrobianos. Este escenario ha planteado la necesidad de buscar enfoques de tratamiento alternativos. Las plantas medicinales, con su historial bien

establecido, son un excelente recurso de producto natural utilizado como terapia alternativa. Los agentes antibacterianos provenientes de las plantas pueden actuar como fuentes importantes de nuevos antibióticos, inhibidores de bombas de eflujo, compuestos dirigidos a la virulencia bacteriana, que pueden usarse solos o en combinación con fármacos existentes (Mushtaq y col., 2018).

Si bien los antibióticos han tenido un gran impacto en la salud de las vacas lecheras y, en consecuencia, en la producción de leche, su uso puede dar lugar a la persistencia de residuos de antibióticos en la leche destinada para consumo humano. Estos residuos representan un problema de salud pública cuando los antibióticos se usan de manera inadecuada en el tratamiento y control de la enfermedad; y fundamentalmente cuando no se respetan los tiempos de espera necesarios. Los antibióticos pueden provocar reacciones adversas en personas alérgicas a estos, y favorecer la selección y diseminación de bacterias resistentes a los mismos (Hameed y col., 2007). La presencia de residuos en leche además de representar un riesgo para el consumidor y de salud pública, constituye un serio problema a nivel económico. La búsqueda de productos naturales eficaces y de bajo riesgo en la producción animal ha ganado importancia en la actualidad. La fitoterapia es la utilización de medicamentos de origen vegetal con fines terapéuticos y su aplicación en la medicina veterinaria se ha fortalecido en los últimos años. El uso de alternativas fitoterapéuticas está orientado a satisfacer las demandas del mercado, que exigen cada vez más productos saludables que garanticen un menor impacto ambiental y que permitan enfrentar la problemática de la resistencia antimicrobiana a los productos terapéuticos convencionales.

Las plantas medicinales son un recurso muy importante que nos permite disponer de moléculas con variadas aplicaciones terapéuticas. Los extractos vegetales son una gran fuente de nuevos compuestos con acción antimicrobiana, que pueden actuar solos o en combinación con fármacos ya existentes. Los mecanismos de acción de los compuestos fitoquímicos pueden diferir de los que presentan los antibióticos convencionales, lo cual podría ser de gran importancia en el tratamiento de bacterias resistentes. La terapia combinada, que asocia

antibióticos convencionales con productos naturales, representa una estrategia prometedora para enfrentar la resistencia a los antibióticos. Hay numerosos reportes que datan del uso de plantas medicinales en medicina etnoveterinaria para el tratamiento de la mastitis bovina, sin embargo, es fundamental estandarizar los extractos y compuestos utilizados para garantizar la eficacia de los mismos (Mushtaq y col., 2018).

En la producción lechera orgánica, los agricultores reemplazan los antibióticos con terapias no tradicionales basadas en plantas medicinales. Las terapias herbales son particularmente importantes para el cuidado de la salud animal en los países en desarrollo. Para obtener la certificación, los productores de leche orgánica deben cumplir requisitos específicos y el uso de tratamientos convencionales (por ejemplo, antimicrobianos) es limitado (Francoz y col., 2017).

La terapia basada en plantas medicinales para mastitis es utilizada en diferentes partes del mundo. Estas al ser utilizadas contra la mastitis bovina pueden tener diferentes propiedades biológicas. Sin embargo, son escasos los datos sobre eficacia antimicrobiana *in vivo* para respaldar el uso de estos tratamientos alternativos. Por lo tanto, es importante validar científicamente diferentes compuestos vegetales empleados como medicamentos, debido a que la producción de principios activos en las plantas varía según las condiciones fisiológicas, edáficas y climatológicas a las que están expuestas, variando la composición de los extractos.

Hase y col. (2013) estudiaron el efecto de una formulación compuesta por extractos de *Cedrus deodara*, *Curcuma longa*, *Glycyrrhiza glabra* y *Eucalyptus globulus* (utilizadas en medicina alternativa por sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, analgésicas, antihistamínicas e inmunomoduladoras) en vacas portadoras de mastitis subclínica. Ellos encontraron que tras 5 días de uso había un aumento en el volumen de leche producida y en el contenido de grasa de la misma, con una reducción en el recuento de células somáticas al aumentar la inmunidad de las ubres en comparación con el grupo control. En otro estudio, Reshi y col. (2017) demostraron la actividad antibacteriana de *Fumaria indica* y

Adiantum capillus in vitro y lograron una disminución en el recuento de células somáticas de vacas con mastitis subclínica tras la administración de infusiones intramamarias de los extractos.

El uso de plantas medicinales con propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras como el *Ocimum sanctum* (atribuidas a componentes activos como el eugenol de su AE y flavonoides) han sido también evaluadas. Shafi y col. (2016) evaluaron el potencial inmunoterapéutico de estas plantas en bovinos con mastitis, para ello administraron por la vía oral el extracto de hojas durante una semana y encontraron una disminución en las infecciones intramamarias del 69.23%, una reducción significativa en el recuento de células somáticas y una disminución de la inflamación de la ubre. Por otra parte, hubo un aumento en la actividad fagocítica de los neutrófilos de la leche junto con un incremento de la actividad enzimática lactoperoxidasa y mieloperoxidasa, demostrando su potencial inmunomodulador en el tratamiento de mastitis subclínica. Otra especie vegetal con importante actividad estimulante del sistema inmunológico es el *Panax ginseng*. Hu y col. (2001) administraron en forma subcutánea el extracto de la raíz de esta planta a vacas con mastitis subclínica causada por *S. aureus*. Lograron incrementar la actividad fagocítica y oxidativa de los neutrófilos, y por lo tanto activar la inmunidad innata de las vacas, favoreciendo así la recuperación de la mastitis. Por otra parte, Beccaria y col. (2018) observaron que el extracto de *P. ginseng* también disminuye la internalización de *S. aureus* en la línea celular epitelial mamaria bovina MAC-T, lo cual es interesante para la prevención de este tipo de infecciones en el tejido mamario.

Los AEs son mezclas de compuestos volátiles aislados de plantas, y sus principales componentes químicos poseen una amplia gama de potenciales inhibidores bacterianos. Pueden actuar como bacteriostáticos o bactericidas y sus principios activos tienen una gran variedad de sitios diana de acción, principalmente en la membrana plasmática y el citoplasma, y en ciertas situaciones, alteran por completo la morfología de las células. Los efectos de los AEs generalmente conducen a la desestabilización de la bicapa de fosfolípidos, la

destrucción de la función y composición de la membrana plasmática, la pérdida de componentes intracelulares vitales y la inactivación de los mecanismos enzimáticos (Nazzaro y col., 2013).

Existen escasos estudios *in vivo* con AEs, Byung-Wook y col. (2015) trataron la mastitis clínica en vacas con AE de *Origanum vulgare*. Se ha observado una disminución de la infección por *S. aureus* sin causar hinchazón, enrojecimiento, dolor y aumento de temperatura en la ubre. En el mercado se encuentran algunos productos a base de AEs para la aplicación intramamaria, como Phyto-Mast. Este se recomienda para uso intramamario en lactancia y secado. El AE de tomillo (*Thymus vulgaris*) es el componente activo antimicrobiano (Mullen y col., 2014) y al utilizarlo en bovinos no presentó ningún efecto irritante e inflamatorio. En cuanto a los residuos en leche (tomando como marcador al timol), solo se detectaron 12 horas después de la administración intramamaria a cabras (McPhee y col., 2011) y vacas (Armorini y col., 2016). Estos hallazgos nos permiten considerar la viabilidad de administrar AEs en forma intramamaria en un futuro como parte de la terapéutica frente a mastitis. Resulta de gran interés poder aprovechar los metabolitos secundarios producidos por plantas con potencial farmacológico en el control de la mastitis bovina en el marco tanto de la problemática de la resistencia bacteriana como en la búsqueda de producciones orgánicas libres de residuos químicos. Sin embargo, es fundamental estandarizar los extractos para asegurar la calidad y eficacia de las formulaciones.

I.6. Aceites esenciales

I.6.1. Definición y usos comunes

Los AEs son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos por organismos vivos y aislados por medios físicos (prensado, extracción con solventes y destilación) de una planta entera o de una parte de la planta de origen taxonómico conocido. Técnicamente, los AEs no son verdaderos aceites, ya que no tienen un contenido de lípidos, sino que son compuestos volátiles altamente

complejos que consisten en alrededor de 20-60 componentes en distintas concentraciones. Los componentes comprenden dos grupos relacionados biosintéticamente, terpenos y compuestos aromáticos. En esta mezcla de componentes múltiples, dos o tres compuestos principales están presentes en relativamente altas concentraciones (20-70%) en comparación con otros componentes que están presentes en cantidades traza (Yap y col, 2014). Los compuestos principales derivan de tres rutas biosintéticas: la vía del mevalonato conduce a los sesquiterpenos; la ruta del metil-eritrol lleva a los monos y diterpenos; y la vía del ácido shikimico a los fenilpropanos. Sin embargo, hay una enorme cantidad de sustancias individuales y una gran variación en la constitución de los AEs. La composición de los AEs está representada principalmente por hidrocarburos mono y sesquiterpénicos y sus derivados oxigenados (hidroxilo y carbonilo), junto con aldehídos alifáticos, alcoholes y ésteres. Los terpenos se pueden considerar como la clase más estructuralmente variada de productos naturales de plantas, derivados de la fusión repetitiva de unidades de cinco átomos de carbono ramificados (unidades de isopreno) (Croteau y col., 2000). Muchas de estas sustancias volátiles tienen diversas funciones ecológicas, pueden actuar como mensajeros internos, como sustancias defensivas contra herbívoros, patógenos e insectos enemigos naturales o como volátiles atrayentes de insectos polinizadores (Harrewijn y col., 2001). Según la familia de compuestos químicos que prevalezca en la mezcla, los AEs se pueden clasificar en los siguientes tres grupos principales (Stashenko, 2009):

- Tipo monoterpenoide: la mayoría de las sustancias presentes en el aceite son monoterpenos y sus análogos oxigenados;

- Tipo sesquiterpenoide: cuando en el aceite predominan sesquiterpenos y sus derivados oxigenados; y

- Aceites ricos en compuestos fenólicos y fenilpropanoides y compuestos oxigenados no terpénicos.

En la vida cotidiana existe una aplicación continua de AEs. Se utilizan en una gran variedad de formas. Las industrias de alimentos, farmacéutica, de sabores y

de fragancias son grandes receptoras de este tipo de extractos. Un área más especializada se da en los campos de la aromaterapia y la aromacología. En años recientes, la importancia de los AEs como biocidas y repelentes de insectos ha dado lugar al estudio de su potencial antimicrobiano. Los AEs son también buenas fuentes naturales de sustancias que sirven como materiales de partida para la síntesis química de compuestos de gran interés comercial. La humanidad ha utilizado los AEs durante cientos de años, incluso milenios (Halberstein, 2005). Mucho antes de ser usados como fragancias en perfumes, se reconoció la importante acción de estos como medicamentos. Sin la atención médica de la que disfrutamos en nuestro tiempo, la autocuración era la única opción para combatir parásitos, patógenos o dolencias del organismo. Más tarde se utilizaron AEs en la preparación de cosméticos, polvos y jabones (Pauli y Schilcher, 2010).

I.6.2. Métodos de extracción

Los métodos de obtención de los AEs varían, entre otras cosas, en base al tipo de material vegetal del cual se va a obtener la esencia. Los principales métodos utilizados para obtener AEs a partir de plantas aromáticas son: la expresión mecánica (o prensado en frío), probablemente el más antiguo, utilizado casi exclusivamente para la producción de aceites provenientes de cítricos; la extracción con solventes orgánicos; y la destilación por arrastre de vapor de agua.

I.6.2.1. Expresión mecánica

Los métodos directos se aplican principalmente a los cítricos, porque sus aceites están presentes en la corteza de la fruta, y el calor de los métodos de destilación puede alterar su composición. El aceite de los cítricos está contenido en numerosas glándulas secretoras del epicarpio. El proceso se basa en la ruptura de las glándulas secretoras de aceite y en recolectar la esencia. La extracción del aceite se produce en una serie de etapas: i) Corte de la epidermis y de las glándulas que contienen la esencia; ii) Creación de zonas de mayor presión desde donde fluye la esencia hacia el exterior y iii) Abrasión de la cáscara. Al exprimir la corteza,

tales glándulas se rompen y liberan el aceite, el cual se recoge inmediatamente y se filtra para liberarlo de partículas. La expresión mecánica para AEs de cítricos se basa en la facilidad de obtención por prensado de la cáscara y la inestabilidad térmica relativa de los aldehídos y algunos hidrocarburos y ésteres terpénicos contenidos en los aceites de la cáscara (Shmidt, 2010).

I.6.2.2. Extracción mediante solventes

Este método está basado en la facilidad con la que los disolventes orgánicos penetran en el material vegetal y disuelven los AEs. La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como éter de petróleo, pentano, éter etílico, alcohol, cloroformo. Estos solventes solubilizan la esencia y extraen otras sustancias tales como ácidos grasos, ceras y pigmentos, que se pueden separar por destilación. Una ventaja que tiene el uso de solventes en la extracción es que pueden actuar a bajas temperaturas, por lo cual no se produce termodestrucción ni alteración química de los componentes del aceite. Además, ofrece la posibilidad de separar componentes individuales y/o presentes en poca cantidad mediante purificación de fracciones. La técnica de solventes a menudo se utiliza a escala de laboratorio, ya que a escala industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes. Se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, algunas veces tóxicas (Shmidt, 2010).

I.6.2.3. Destilación por arrastre de vapor

Este método es el que presenta mayor aplicación en los sistemas de producción de AEs. La destilación puede definirse en forma simple como la evaporación y posterior condensación de un líquido. Durante el proceso se produce la liberación del AE presente en las glándulas secretoras (células) de la planta debido a la ruptura de las paredes celulares a causa del aumento de presión ocasionado por la expansión generada por el contenido celular como resultado del calor del proceso. Una vez liberado, el aceite se volatiliza y es transportado por el flujo de vapor de agua, actuando como portador de las moléculas de AE. Este tipo de

extracción puede hacerse de tres maneras distintas, en base a la forma en la que se pone en contacto el material vegetal con el vapor (Figura 3).

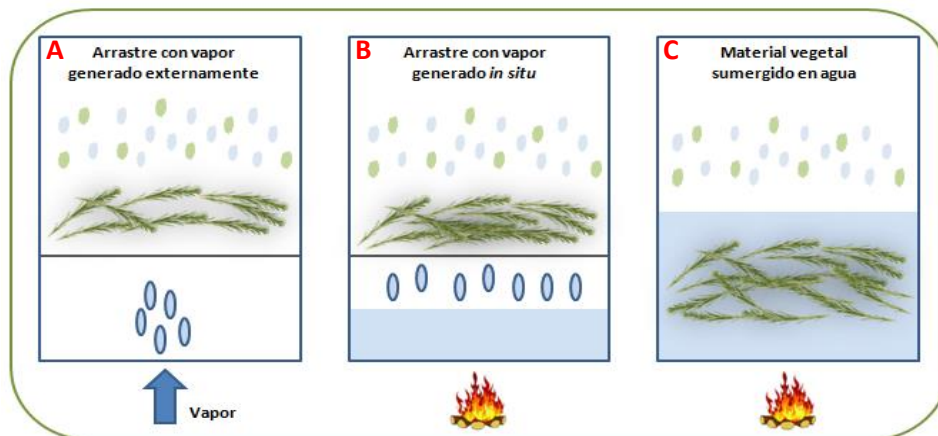


Figura 3. Formas de destilación de arrastre de vapor de agua: Generación de vapor externa (A), generación de vapor *in situ* (B), calentamiento de material vegetal sumergido (C).

El método más simple es mediante hidrodestilación, en donde se realiza la inmersión de la biomasa en agua hirviendo (Figura 3C). Este método se utiliza para la destilación de material vegetal delicado, como por ejemplo flores. La biomasa absorbe agua durante el proceso de ebullición y el aceite contenido en las células secretoras difunde a través de las paredes de la célula mediante ósmosis. Una vez que el aceite ha difundido fuera de las células secretoras, se vaporiza y es arrastrado por la corriente de vapor para luego condensarse en el sistema de enfriamiento. La mezcla de vapor de agua y compuestos volátiles llega al condensador donde pasan a estado líquido y el aceite se separa del agua condensada por diferencia de densidad (Shmidt, 2010).

Otro de los métodos consiste en separar físicamente la producción de vapor y el material vegetal (Figura 3A). Con este método se puede evitar el calcinamiento de parte del material vegetal por aplicación de fuego directo para la calefacción. Aquí se genera vapor de agua en una caldera externa y se hace llegar al depósito con biomasa para que circule y genere la liberación del AE. La llegada de vapor al tanque con biomasa puede realizarse de varias maneras. Comúnmente, el vapor

se conduce directamente al alambique a través de su parte inferior. De este modo, se evita el sobrecalentamiento y la biomasa se calienta rápidamente. También permite la regulación de la cantidad y presión de vapor, reduce el tiempo de destilación y mejora la calidad del aceite. En otra variante, el vapor se inyecta en forma de espiral. Este método es más efectivo ya que el vapor entra en contacto con una mayor superficie de biomasa. La velocidad con la que se lleva a cabo el proceso depende de la naturaleza del material vegetal. El vapor sobrecalentado penetra el material vegetal a presión más alta que la atmosférica, rompe las células o canales oleíferos en la planta y arrastra la mezcla volátil, que se condensa luego de atravesar un refrigerante. Generalmente, los aceites son más livianos que el agua y muy poco solubles en ella, por ende, pueden ser separados por decantación. La excepción la presenta el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), que es más pesado que el agua y se recoge debajo de ella. El método de arrastre con vapor se usa para extraer aceites de rizomas, raíces, semillas (valeriana, jengibre, anís, etc.) y de hojas secas o fermentadas de algunas plantas, como por ejemplo el patchoulí (Stashenko, 2009).

Existe otra variante de la destilación por arrastre de vapor de agua, la cual implica generación de vapor en el mismo contenedor en que está el material vegetal (Figura 3B). En este sistema de extracción se emplea un vapor húmedo, proveniente del agua en ebullición, que traspasa el material vegetal, que se encuentra suspendido encima y soportado por una malla. Este método es el más utilizado para hacer extracciones de AE de plantas herbáceas. El equipo se compone por un recipiente fijo (un tambor de acero inoxidable), una placa de metal cribada fija ubicada por encima del nivel deseado del agua, y una tapa con salida de cuello de cisne. La tapa cuenta con una junta para evitar fugas de vapor. La salida de vapor se encuentra unida a un condensador (generalmente un serpentín colocado en un tanque por el que circula agua fría). Por último, el equipo cuenta con un recipiente colector, que separa el aceite del agua destilada enriquecida con compuestos volátiles (llamada hidrolato). Comúnmente se utiliza un vaso florentino colocado en el extremo del serpentín. Como primera medida

para operar el equipo, se agrega un volumen de agua en el fondo que no sobrepase la malla perforada. Luego, la biomasa se coloca sobre la placa con perforaciones hasta llenar el tanque de destilación, en lo posible utilizando la mayor cantidad de material vegetal disponible. Posteriormente se colocan la tapa, conexiones, serpentín y el colector. Por último, se inicia el calentamiento del agua, ya sea mediante una resistencia eléctrica o fuego directo, lo cual dependerá del diseño del aparato (Shmidt, 2010).

I.6.3. Factores que inciden en la producción

La producción de AEs está condicionada por diversos factores propios de la planta y del ambiente en que se cultivan. Muchos de ellos inciden sobre la composición y el rendimiento de AE en la planta. Entre los factores agronómicos que inciden encontramos el clima, el tipo de suelo, la influencia de la sequía y el estrés hídrico, el estrés causado por insectos y microorganismos, propagación (semilla o clones), prácticas de cultivo y estado de desarrollo de la planta (Rioba y col., 2015). Otros factores importantes incluyen la parte de la planta que se va a utilizar, la ubicación de las células oleíferas dentro de la planta, el momento de la cosecha, el método de recolección, el almacenamiento y la preparación de la biomasa antes de la extracción del AE. Los factores geo-climáticos y el tipo de suelo pueden dar origen a diferentes quimiotipos de la planta, de los cuales se destilan AEs con composición química, propiedades sensoriales y actividad biológica diferentes (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017).

I.6.4. Parámetros de calidad de AEs

El precio de un AE, su valor comercial y, sobre todo, su aplicación en diferentes ramas de la industria, están relacionados directamente con sus propiedades físico-químicas, olor, actividad biológica y, fundamentalmente, con la composición química, que comprende no solamente compuestos mayoritarios sino también aquellos presentes a nivel de trazas. Por ello es necesaria la caracterización física,

química y sensorial completa del aceite. Los métodos analíticos deben contemplar la gran variabilidad de moléculas que contienen los AEs.

Los procedimientos que suelen aplicarse para determinar la pureza de los AEs incluyen: análisis del olor, color y sabor; densidad relativa a 20 °C; solubilidad en agua, aceite mineral, etanol y mezclas etanol-agua; determinación de índices de acidez y esterificación; medición del índice de refracción y rotación óptica; y análisis de la composición por métodos cromatográficos (Stashenko, 2009).

Los índices de acidez, esterificación, refracción y rotación óptica están definidos en la Farmacopea Argentina VII Edición. El índice de acidez se establece por el contenido de ácidos grasos libres, definido como la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos libres presentes en 1.0 g de muestra. El índice de esterificación se define como la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para saponificar los ésteres presentes en 1.0 g de muestra. El índice de refracción se puede determinar mediante un refractómetro de Abbé y se establece como la relación (n) entre la velocidad de la luz en el espacio y la velocidad de la luz en un medio determinado (también expresado como los senos de los ángulos de incidencia y de refracción); esta relación tiende a disminuir ligeramente cuando aumenta el peso molecular. Si la radiación incidente pasa de un medio menos denso, n será menor que 1. Por último, la rotación óptica es la rotación de un plano de polarización de un haz de luz polarizada plana por una sustancia ópticamente activa; viene dada por un ángulo α , que forman los planos de polarización del haz incidente y el haz emergente en la sustancia, denominado ángulo de rotación óptica. Para expresar los datos de rotación óptica en una forma lógica, para establecer comparaciones, hay que escoger condiciones estándares. La polarimetría mide el ángulo de rotación del plano de vibración de la luz polarizada, cuando ésta atraviesa un medio que contiene una sustancia ópticamente activa. Para ello se utiliza el polarímetro.

La técnica cromatográfica empleada rutinariamente para determinar la composición de un AE es la gaseosa (GC), debido a que los constituyentes de los aceites son sustancias volátiles (monoterpenoides, ésteres, etc.) o semi-volátiles,

volatilizables (sesquiterpenoides, derivados fenólicos, etc.), cuyas temperaturas de ebullición no exceden los 230 – 250°C. Un sistema cromatográfico comprende cuatro bloques fundamentales, entre los cuales figuran los siguientes: sistema de aplicación de la muestra (inyector); sistema de separación de la mezcla (columna); sistema de detección de analitos eluidos de la columna (detector) y, finalmente el sistema de datos (Grob y Barry, 2004).

I.6.5. Propiedades antimicrobianas y mecanismos de acción

Los AEs y sus principales componentes químicos poseen una amplia gama de potenciales inhibidores bacterianos. Pueden inhibir el crecimiento de bacterias (bacteriostáticos) o destruir las células bacterianas (bactericidas). Los AEs contienen numerosos metabolitos secundarios que también pueden inhibir o disminuir el crecimiento bacteriano. Sus componentes tienen una gran variedad de sitios diana de acción, principalmente la membrana plasmática y el citoplasma, y en ciertas situaciones, alteran por completo la morfología de las células. Los efectos de los AEs generalmente conducen a la desestabilización de la bicapa de fosfolípidos, la destrucción de la función y composición de la membrana plasmática, la pérdida de componentes intracelulares vitales y la inactivación de los mecanismos enzimáticos (Nazzaro y col., 2013).

La actividad antimicrobiana de los AEs difiere de un tipo a otro, así como también el tipo de bacterias sobre las que actúan (bacterias Gram-positivas y Gram-negativas). En general, las bacterias Gram-negativas son más tolerantes a los AEs que las bacterias Gram-positivas (Trombetta y col., 2005). La estructura de la pared celular de bacterias Gram-positivas permite que las moléculas hidrofóbicas penetren fácilmente en las células y actúen tanto sobre la pared celular como dentro del citoplasma. Los compuestos fenólicos, que también están presentes en los AEs, generalmente muestran actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas. Su efecto depende de la cantidad del compuesto presente, en bajas concentraciones pueden interferir con enzimas involucradas en la producción de energía, y en concentraciones más altas pueden desnaturalizar proteínas (Tiwari y col., 2009).

La pared celular de las bacterias Gram-negativas es más compleja. Tiene una capa de peptidoglicano más delgada que las Gram-positivas, posee una membrana externa por fuera de la fina pared celular. La presencia de la membrana externa es una característica que diferencia ambos grupos de bacterias. Se compone por una doble capa de fosfolípidos que está ligada a la membrana interna por lipopolisacáridos. La bicapa externa que contiene lipopolisacárido sirve como una barrera eficaz para prevenir la penetración rápida de estos antibióticos lipófilos y agentes quimioterapéuticos, lo que vuelve a las bacterias Gram-negativas más resistentes a los AEs y a otros extractos naturales con actividad antimicrobiana. Los solutos hidrofílicos pequeños pueden atravesar la membrana externa a través de abundantes proteínas, porinas, que actúan como canales hidrofílicos transmembrana. En el caso de los compuestos hidrofóbicos el ingreso a bacterias Gram-negativas se dificulta (Nikaido, 1994). Sin embargo, algunas moléculas hidrofóbicas pueden atravesar lentamente las porinas (Plesiat y Nikaido, 1992).

La actividad antimicrobiana de los AEs, al igual que todos los extractos naturales, depende de su composición química y de la concentración de cada componente. Muchos de los compuestos antimicrobianos se expresan constitutivamente por las plantas, y otros se pueden sintetizar como mecanismos de autodefensa en respuesta a los patógenos. Estas moléculas pueden estar presentes de forma natural en su forma activa en la planta o pueden ser activadas por enzimas específicas cuando el organismo vegetal está sometido a un estrés biótico o abiótico particular (Holley y Patel, 2005).

La actividad antimicrobiana de los AEs no es atribuible a un único mecanismo de acción, sino que es una cascada de reacciones que involucran a toda la célula bacteriana (Burt, 2004), es decir, actúan mediante varios mecanismos de acción simultáneamente. Estos extractos principalmente desestabilizan la estructura celular, llevando a la ruptura de la integridad de la membrana y al aumento de la permeabilidad. De este modo se interrumpen muchas actividades celulares, incluida la producción de energía (acoplada a membrana), transporte de membrana y otras funciones metabólicas reguladoras. Esto ocasiona problemas

en el procesamiento de nutrientes, la síntesis de macromoléculas estructurales y la secreción de reguladores del crecimiento (Oussalah y col., 2006). Debido a su naturaleza lipófila, los AEs penetran fácilmente a través de las membranas de las células bacterianas. Existen publicaciones en las que se han reportado que ciertos AEs causan un aumento de la permeabilidad de la membrana de las células bacterianas, provocando la pérdida de componentes celulares e iones (Oussalah y col., 2006; Raut y Karuppaiyil, 2014). El efecto antibacteriano de los AEs también está relacionado con la disminución de los potenciales de membrana, la alteración de las bombas de protones y el agotamiento del ATP. Esta alteración en la organización celular como mencionamos puede causar un efecto de cascada, por lo que otras organelas celulares también se ven afectadas. Los AEs pasan a través de la pared celular y de la membrana citoplásmica, lo que puede alterar la disposición de diferentes ácidos grasos, bicapas de fosfolípidos y moléculas de polisacáridos (Swamy y col., 2016).

Hasta el momento no existen trabajos que describan la actividad antimicrobiana de AEs frente a infecciones intracelulares causadas por *S. aureus* en PMNs. Federman y col. (2016) lograron obtener un importante efecto antibacteriano del AE de naranja valenciana frente a *S. aureus* internalizado en una línea celular epitelial mamaria bovina (MAC-T). En cuanto a infecciones intracelulares en PMNs, Tullio y col. (2019) evaluaron la influencia del AE de *Melaleuca alternifolia* y de "Menta de Pancalieri" sobre la muerte intracelular de *Candida krusei* fagocitada por PMNs aislados de sangre humana. En este trabajo se encontró que ambos AEs lograron mayor eficacia frente al microorganismo que utilizando anidulafungina (antifúngico de referencia). Esto sugiere una interacción positiva entre los AEs y los PMNs para erradicar *C. krusei* intracelular, aunque fue necesario utilizar concentraciones de los extractos vegetales menores a la concentración inhibitoria mínima (CIM), debido a su toxicidad frente a los PMNs.

I.6.6. Combinación con antibióticos

En la actualidad existe a nivel mundial un resurgimiento en el uso de hierbas medicinales. La explotación de productos naturales para usos medicinales es una tendencia floreciente hoy en día. Estos son vistos como un grupo privilegiado de estructuras que ha evolucionado para interactuar con una amplia variedad de dianas. Se han realizado varios estudios para evaluar el posible papel de los extractos de plantas y algunos compuestos activos en su eficacia para combatir los problemas de resistencia bacteriana a los antibióticos. La terapia combinada, que asocia antibióticos convencionales con productos naturales, representa una estrategia prometedora para superar esta problemática (Elshafie y col., 2015; Mancini y col., 2014). Cuando se combinan fármacos, ocurre sinergia si el efecto combinado es mayor que la suma de los efectos individuales. En cambio, se produce antagonismo cuando el efecto combinado es menor al obtenido por los dos compuestos aplicados individualmente. La indiferencia se observa cuando no hay interacción entre unos y otros. Las combinaciones sinérgicas presentan mayor eficacia y menor toxicidad que sus componentes aislados. Debido a una actividad multidiana, tales combinaciones podrían dificultar la selección de resistencia a los antibióticos y, por lo tanto, podrían maximizar la eficacia frente a cepas microbianas resistentes a múltiples fármacos (Van Vuuren y Viljoen, 2011).

En la bibliografía se encuentran múltiples trabajos que dan cuenta de la actividad sinérgica entre AEs y antibióticos. Si y col. (2008) han reportado la presencia de actividad antimicrobiana sinérgica al combinar AE de *Origanum vulgare* (orégano) con doxiciclina y florfenicol frente a cepas de *E. coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido. También, se puede mencionar al AE de *Pelargonium graveolens*, que logró reducir la dosis mínima eficaz de norfloxacina frente a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *S. aureus* (Rosato y col., 2007). Rodríguez y col. (2009) informaron que el AE de hojas de *Croton zehntneri* es capaz de potenciar la actividad de gentamicina en un 42.8% frente a *P. aeruginosa* a través del contacto gaseoso, lo que sugiere que el aceite posee un potencial para ser utilizado como coadyuvante en la terapia antimicrobiana.

1.7. *Melaleuca armillaris*

Melaleuca armillaris Sm. (Figura 4) pertenece a la familia de las Myrtaceae, plantas dicotiledóneas leñosas ubicadas dentro del orden Myrtales, perteneciente a la serie de órdenes corolianos de gineceo ínfero, conteniendo más de 5.650 especies organizadas en 130 a 150 géneros (Govaerts y col., 2008). Esta es conocida como la octava familia más grande de plantas de floración, que comprende varios géneros de excepcional relevancia ecológica y económica en todo el mundo.

La familia se encuentra principalmente en el hemisferio sur. Cuenta con centros de diversidad en los trópicos húmedos, especialmente América del Sur, Australia y Asia tropical, con presencia también en África y Europa. Esta familia se encuentra comúnmente en muchos de los lugares de mayor biodiversidad del mundo, como el suroeste de Australia y la Selva Atlántica de Brasil, donde pueden encontrarse más de 90 especies de Myrtaceae por hectárea, muchas de las cuales no han sido descritas aún (Govaerts y col., 2008).



Figura 4. Planta de *M. armillaris*. (Fuente: Manzaner Molina, 2005).



Figura 5. Inflorescencias de *M. armillaris*. (Fuente: Manzaner Molina 2005).

Las plantas de la familia Myrtaceae son árboles, arbustos o subarbustos de hojas simples, enteras, con AEs en las cavidades secretoras esquizógenas; flores actinomorfas, hermafroditas, con una cantidad de piezas florales múltiplo de 4 o de 5, generalmente con muchos estambres; frutos en forma de cápsulas, drupas o bayas; floema localizado a ambos lados del xilema (no solo por fuera como en la mayoría de las plantas) y punteaduras en los vasos del xilema (Wilson y col., 2001).

Con alrededor de 260 especies, *Melaleuca* es uno de los principales géneros de Myrtaceae y es el segundo con más especies en Australia después del *Eucalyptus*. Las especies de *Melaleuca* pueden ser árboles o arbustos pequeños, los cuales tienden a ocupar el nicho de los humedales y son comúnmente dominantes en el sotobosque de bosques de eucalipto. Están muy extendidas en Australia, el sudeste de Asia, y Nueva Caledonia. El género se caracteriza por largos racimos de flores (Figura 5), las cuales se asemejan a un cepillo (Grattapaglia y col., 2012).

En esta Tesis nos centraremos en *Melaleuca armillaris* Sm., una de las plantas del género *Melaleuca* más ampliamente cultivadas. Es comúnmente conocido como *Honey bracelet myrtle* y crece en forma de arbusto grande o como árbol pequeño. Los reportes de la literatura acerca de *M. armillaris* siguen siendo escasos. Investigaciones por GC-MS (Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas) de su AE revelaron la presencia de 1.8-cineol como componente principal (Chabir y col., 2011; Hayouni y col., 2008; Silva y col., 2007).

Se han determinado varias actividades para este AE. Rizk y col. (2012) obtuvieron buenos resultados *in vivo* utilizando este AE en el tratamiento contra el parásito *Schistosoma mansoni*, respondiendo frente a la actividad oxidante generada por el patógeno. También se encontró actividad inhibitoria, *in vitro*, frente a diversas especies bacterianas como *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (Amri y col., 2012). Chabir y col. (2011) determinaron actividad anticancerígena por el efecto citotóxico que presenta sobre las células del cáncer de mama MCF7.

Las actividades observadas para el AE de *M. armillaris* en forma pura permiten suponer que los buenos resultados obtenidos por si solos pueden incrementarse en sistemas sinérgicos para el mismo fin, como el mejoramiento de antibióticos para tratar infecciones ocasionadas por cepas resistentes al tratamiento convencional. No se ha encontrado hasta el momento bibliografía indicando el uso del AE de *M. armillaris* como potenciador de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones de origen bacteriano, particularmente contra cepas de *S. aureus*. Este patógeno, como fue mencionado, es muy resistente a los antibióticos, y es responsable de un alto porcentaje de infecciones hospitalarias y comunitarias. El uso indiscriminado de antimicrobianos está generando microorganismos resistentes a múltiples fármacos, convirtiéndose en un grave problema para la salud mundial (OMS, 2018a).

Resulta interesante la búsqueda de soluciones a estos problemas, partiendo de los tratamientos ya existentes y con la ayuda de nuevas estrategias basadas en extractos de plantas, que están demostrando un gran potencial para abordar el tema.

I.8. Hipótesis

- Los AEs al ser combinados con antibióticos convencionales potencian la acción antibacteriana de los mismos.
- Los AEs, por ser multicomponentes, disminuyen la capacidad de desarrollar resistencia bacteriana.
- Una combinación de antimicrobianos con AEs que demuestre efecto sinérgico *in vitro* tiene alta probabilidad de ser eficaz para el tratamiento de infecciones bacterianas, independientemente del patrón de sensibilidad del microorganismo.
- El AE extraído de *M. armillaris*, es capaz de potenciar la acción antimicrobiana de aquellos agentes a los cuales el *S. aureus* ha disminuido su sensibilidad, recuperando así la eficacia antimicrobiana.

I.9. Objetivo general

Establecer una combinación óptima y de máxima eficacia del AE de *Melaleuca armillaris* con antibióticos ampliamente utilizados para tratar infecciones ocasionadas por *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes.

I.9.1. Objetivos específicos

- 1- Comparar la composición del AE de *M. armillaris* extraído con la publicada en la bibliografía.
- 2- Seleccionar mediante pruebas de sensibilidad bacteriana, agentes antimicrobianos dentro de los siguientes grupos: **β -lactámicos** (penicilina, amoxicilina, oxacilina); **macrólidos** (azitromicina, claritromicina, eritromicina); **glicopéptidos**; **fenicoles** (tianfenicol); **tetraciclinas** (oxitetraciclina, doxiciclina, minociclina); **fluoroquinolonas** (enrofloxacina, danofloxacina, ciprofloxacina, marbofloxacina), **aminoglucósidos** (estreptomina, gentamicina) y **ansamicinas** (rifaximina y rifampicina).
- 3- Determinar la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) *in vitro* de los antimicrobianos seleccionados frente a cepas de referencia y aislamientos salvajes de *Staphylococcus aureus*.
- 4- Establecer la CIM y la CBM *in vitro* del AE de *M. armillaris* frente a cepas de referencia y aislamientos salvajes de *Staphylococcus aureus*.
- 5- Evaluar, mediante pruebas de sinergismo *in vitro*, la eficacia obtenida por la asociación de los antimicrobianos seleccionados con el AE de *M. armillaris*.
- 6- Evaluar citotoxicidad del AE de *M. armillaris* en células eucariotas animales (PMN).
- 7- A partir del objetivo anterior determinar penetración celular de la mezcla AE/antibiótico ensayada, cinética intracelular y eflujo.
- 8- Establecer la eficiencia del sistema elegido mediante modelado matemático. Desarrollar un formulado de aplicación intramamaria que

contenga la mezcla AE/antibiótico más apropiada para tratar mastitis bovina por *S. aureus*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Recolección de *M. armillaris*

Se llevó a cabo la recolección de 44.85 Kg de hojas y ramas herbáceas de plantas ubicadas en las cercanías del partido de Coronel Brandsen, provincia de Buenos Aires (latitud 35°06'18.9"S y longitud 58°10'57.0"O). La obtención del material vegetal de trabajo tuvo lugar en el mes de julio de 2015 y en el mes de julio de 2017. La cosecha se realizó durante la mañana y se llevó inmediatamente al sitio de extracción del AE. Una muestra del material vegetal fue reservada para identificación y depósito en el herbario LPAG de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP (Holmgren y col., 1990). Todo el trabajo experimental fue llevado a cabo con el AE obtenido en julio 2015, mientras que aquel obtenido en julio 2017 fue utilizado para el análisis de composición por cromatografía gaseosa a fin de establecer si existía alguna modificación en el contenido porcentual de los componentes analizados originalmente, así como también corroborar las propiedades físico-químicas.

II.2. Extracción del AE de *M. armillaris*

La extracción del AE a partir del material vegetal recolectado se realizó mediante destilación por arrastre de vapor de agua. En primer lugar, se determinó el rendimiento siguiendo las recomendaciones de la Farmacopea Argentina VII Ed. (2013) utilizando 100 g de hojas recolectadas. De acuerdo con este documento, la determinación de AEs en vegetales se lleva a cabo mediante extracción por arrastre con vapor de agua en un aparato apropiado, denominado clevenger (Figura 6), que consta de un balón y de un condensador. El AE es recolectado en un tubo graduado empleando xileno para fijarlo, mientras que el agua retorna al balón de extracción. Las diferentes partes del condensador están construidas en una sola pieza de vidrio de bajo coeficiente de expansión. El tapón K' tiene una abertura y el tubo K posee un orificio de 1 mm de diámetro, el cual coincide con la ubicación de la abertura del tapón. El extremo final del tubo K es esmerilado y

tiene un diámetro interno de 10 mm; un tubo en forma de pera J de 3 mL de capacidad; un tubo JL graduado en 0.01 mL; un tubo en forma de bulbo de aproximadamente 2 mL de capacidad y una válvula de tres vías M. La unión B se encuentra a 20 mm de la graduación máxima superior.

Para comenzar el proceso se coloca el material vegetal en el balón, se agregan algunos trozos de plato poroso y se coloca el condensador. Se introduce agua a través del tubo de llenado N hasta el nivel B. Se retira el tapón K' y se transfiere la cantidad indicada de xileno empleando una pipeta con su extremo en la parte inferior del tubo K, luego se coloca el tapón K' nuevamente, asegurándose que los orificios de K y K' coincidan entre sí. Se procede a calentar el líquido en el balón hasta ebullición y se ajusta la velocidad de extracción a aproximadamente 2 mL por minuto. Para determinar la velocidad de extracción, se debe disminuir el nivel de agua por medio de la válvula de tres vías hasta que el menisco se encuentre en la marca inferior a. Cerrar la válvula y medir el tiempo que toma el líquido en alcanzar la marca superior b. Abrir la válvula y continuar con la extracción, modificando el calentamiento para regular la velocidad de extracción. La extracción se lleva a cabo durante 30 minutos. Finalmente, se detiene el calentamiento y se lee el volumen de xileno, donde el AE se ha disuelto, en el tubo graduado después de por lo menos 10 minutos. La diferencia entre el volumen inicial y final del xileno indica la cantidad de esencia extraída. Por último, se expresa la cantidad de AE extraído cada 100 g de muestra.

Luego se procedió a la destilación de toda la biomasa cosechada. Se utilizó la técnica de extracción de AEs por arrastre de vapor de agua con generador de vapor *in situ*. El equipo de destilación utilizado tiene una capacidad de 385 litros. Se utilizaron 38.5 litros de agua para la destilación por arrastre de vapor de 44.75 Kg de hojas y ramas herbáceas. El proceso completo de destilado duró 5 horas y se extrajeron 550 mL de AE en julio 2015 y 515 mL en julio 2017. Las esencias extraídas fueron secadas con cloruro de sodio anhidro, filtradas y guardadas en frascos de vidrio color ambar en heladera a 4°C.

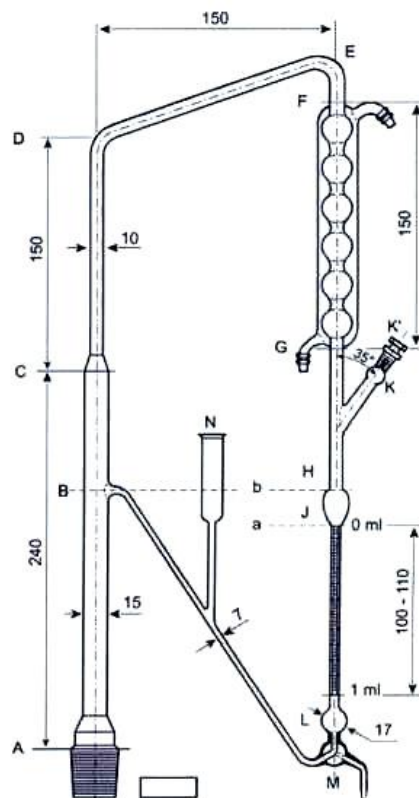


Figura 6. Equipo de destilación tipo Clevenger para la determinación de AEs en drogas vegetales. Las dimensiones son mm. (Fuente: FA VII Ed., 2013).

II.2.1. Caracterización del AE

II.2.1.1. Determinación de la composición del AE

La composición de las dos muestras de AE (julio 2015 y julio 2017) fueron analizadas en el IQUIMEFA-CONICET-UBA a cargo del Prof. Dr. Arnaldo Bandoni. Dicho análisis se llevó a cabo mediante un cromatógrafo GC-FID-MS Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 7890A/5975C equipado con un inyector (split ratio 1:100) conectado por un flow splitter de dos columnas capilares (HPWAX y DB-1-MS, ambas de 60 m × 0.25 mm con 0.25 micrones de fase estacionaria). La columna polar fue conectada a un FID, mientras que la columna no polar se conectó a un detector de masa cuadrupolar (HP 5975C) (70 eV). Se utilizó Helio como gas portador, a un flujo de 1.8 mL/min. La temperatura del inyector se estableció en 250 °C. El volumen de inyección fue de 0.3 μ L. La temperatura de la columna se programó de acuerdo con el siguiente gradiente:

100 °C, aumento de 2 °C/min hasta 240 °C y mantenido en forma constante durante 15 min. La temperatura del FID fue 260 °C y las temperaturas para la línea de transferencia y la fuente iónica se establecieron en 280 y 230 °C, respectivamente. El rango de masa (m/z) fue 40–500 Da. La adquisición de datos, el procesamiento y el control del instrumento se realizaron utilizando el software Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La identificación de los compuestos se logró mediante el análisis de los índices de retención (relativos a C8–C24 n-alcános) obtenidos en ambas columnas y comparados con los de los compuestos de referencia, compuestos identificados en AEs químicamente conocidos y de la bibliografía (Joulain y König, 1998; Babushok y col., 2011). Además, cada espectro de masas obtenido se comparó con el existente en las bibliotecas (Joulain y König, 1998; Adams, 2007; Wiley/NIST, 2008) y con los espectros de masas obtenidos a partir de los compuestos de referencia. La contribución relativa porcentual de los compuestos se calculó a partir de las respuestas FID mediante una integración computarizada suponiendo que todos los factores de respuesta fueron 1.

2.1.2. Determinación parámetros físicos-químicos

Se establecieron índices y factores correspondientes al control de calidad de AEs (Plaza y Ricalde, 2015) con el fin de caracterizar al AE de *M. armillaris*, ya que no se encuentra descrito en la bibliografía. Para ello se observaron factores como: aspecto a 20 °C, olor, sabor, color, índice de refracción, densidad (mediante uso de picnómetro) y pH. También, se verificó la solubilidad en distintos solventes: aceite mineral (1:1); agua (1:10) y etanol 70% (1:1).

Por otra parte, se determinaron los índices de acidez y esterificación siguiendo las recomendaciones de la FA VII Ed.:

-Índice de acidez (contenido de ácidos grasos libres, definido como la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos libres presentes en 1.0 g de muestra). Se disolvieron 10.0 g de muestra, exactamente pesados y

previamente neutralizados frente a la fenolftaleína con hidróxido de sodio 0.1 N, en 50 mL de etanol contenidos en un Erlenmeyer. Se agregó 1 mL de fenolftaleína (preparada al 1% en etanol) y se tituló con hidróxido de potasio 0.1 N hasta coloración rosada persistente durante 30 segundos. El índice de acidez se calculó como los mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres en un gramo de muestra.

- Índice de esterificación (definido como la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para saponificar los ésteres presentes en 1.0 g de muestra). Se transfirieron 2 g de muestra, exactamente pesados, a un erlenmeyer de 250 mL, se agregaron 25 mL de etanol neutralizado en agitación y 1 mL de fenolftaleína (preparada al 1% en etanol). Se tituló con hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N hasta neutralizar totalmente los ácidos grasos libres. Luego se agregaron 25.0 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N. Se calentó en un baño de María, con un refrigerante apropiado para mantener el reflujo durante 30 minutos, agitando por rotación frecuentemente y se tituló el hidróxido de potasio en exceso con ácido clorhídrico 0.5 N. Se realizó una determinación con un blanco. La diferencia entre los volúmenes, en mL, de ácido clorhídrico 0.5 N consumido por la muestra y el blanco, multiplicado por 28.05 (peso en g de 0.5 equivalentes de hidróxido de potasio) y dividido por el peso, en g, de la muestra tomada, es el Índice de esterificación.

II.3. Aislamientos de campo de *Staphylococcus aureus*

El laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFYT) de la Cátedra de Farmacología Especial y Toxicología de la FCV-UNLP cuenta con una importante cantidad de aislamientos salvajes y cepas obtenidas a lo largo de los últimos 8 años, como así también cuenta con las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y ATCC 29213. Se dispuso de 120 cepas de *S. aureus* obtenidas a campo a partir de proyectos de investigación previos. También, se cuenta con una cepa SARM provista por el INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán. Las cepas de

referencia y SARM, junto con los aislamientos salvajes, se encuentran conservados en caldo tripticasa soya con 15% de glicerol a -70°C , en crioviales autoclavables de 2.5 mL de capacidad.

Las cepas de referencia, SARM y los aislamientos salvajes de *S. aureus* fueron repicadas en agar nutritivo suplementado con 5% de sangre ovina estéril (agar sangre), y llevadas a incubación durante 24 horas a 35°C . Luego las colonias crecidas, se observaron macroscópicamente evaluando características tales como color, tamaño, aspecto general y presencia o ausencia de hemólisis. El *S. aureus* en agar sangre presenta óptimo crecimiento a temperaturas entre $34-37^{\circ}\text{C}$. Tras 18 a 24 horas de incubación, se observan colonias de 1-3 mm de diámetro, de color blanco amarillento, debido a la producción de carotenoides. Posteriormente, fueron repicadas en agar nutritivo y mantenidas en heladera para continuar con los ensayos posteriores.

II.4. Evaluación de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus*

II.4.1. Prueba cualitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana

Se evaluó la susceptibilidad de las cepas de *S. aureus* mediante la técnica de antibiograma por el método Kirby-Bauer (método de difusión en agar). Este método consiste en colocar sobre la superficie de un medio de cultivo sólido inoculado con una concentración estandarizada de la bacteria a analizar, discos de papel impregnados con una cantidad específica de cada antimicrobiano a ensayar. Una vez colocados los discos en contacto con la superficie húmeda del agar y como resultado de la formación de un gradiente de concentración, el antimicrobiano difunde desde el disco (lugar de mayor concentración) hacia el agar (lugar de menor concentración) en forma radial. Transcurridas 18-24 h de incubación, y luego que la concentración del antimicrobiano se diluye al punto de no lograr la inhibición del crecimiento bacteriano, queda en el agar claramente demarcada la zona de inhibición. El diámetro de esta zona se correlaciona inversamente con la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la bacteria testada. La medida de los

diámetros de los halos de inhibición permite interpretar los resultados de acuerdo con las siguientes categorías: sensible (S), intermedia (I) o resistente (R).

II.4.2. Medio de cultivo

El agar Mueller Hinton (AMH) es el medio adecuado para utilizar en las pruebas de susceptibilidad (CLSI, 2008). El medio de cultivo fue preparado siguiendo las recomendaciones del fabricante. Luego de ser esterilizado por autoclave, se mantuvo en baño termostático hasta alcanzar una temperatura de 48 - 50 °C. Utilizando una pipeta de vidrio estéril, 25 mL del medio de cultivo fueron trasvasados a cada una de las placas de Petri. Las mismas se ubicaron sobre una superficie horizontal correctamente nivelada, con el fin de lograr una capa de agar uniforme de 4 mm de profundidad en toda su superficie.

Las placas preparadas fueron mantenidas a temperatura ambiente y una vez gelificado el agar, se llevaron a 4 °C para su utilización al día siguiente. Para comprobar la esterilidad del medio de cultivo, 2 placas preparadas con el agar proveniente de cada matraz utilizado fueron incubadas durante 24 h a 35 °C. El control del pH del medio de cultivo, gelificado y a temperatura ambiente, se realizó con cintas para control de pH (Merck KGaA, Germany) con el fin de corroborar que el medio de cultivo tuviera siempre el pH adecuado: 7.2 – 7.4.

II.4.3. Inóculo bacteriano

El método utilizado para la preparación de los inóculos fue el de suspensión directa de colonias (CLSI, 2013). El día anterior a la realización del antibiograma, todos los aislamientos salvajes y las cepas SARM y de referencia (*S. aureus* ATCC 25923) fueron sembrados en placas con agar nutritivo. Se incubaron durante 20 h a una temperatura de 35 °C. Transcurrido el período de incubación y utilizando un ansa estéril, se tomaron 2 a 4 colonias de cada aislamiento y cada uno de ellos fue inoculado en 5 mL de solución fisiológica estéril. Luego de agitar durante unos minutos se comparó el inóculo con una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de McFarland en solución fisiológica (que equivale aproximadamente a 1×10^8

UFC/mL). Cuando la turbidez fue superior se ajustó con solución fisiológica estéril y cuando fue necesario se agregaron más colonias del aislamiento correspondiente (CLSI, 2013).

Para la preparación del tubo con solución correspondiente al 0.5 de la escala de McFarland se diluyeron 0.5 mL de cloruro de bario 0.048 M (1.173 g de cloruro de bario dihidrato, 1.175% m/v) en 99.5 mL de ácido sulfúrico 0.18 M (0.36 N, 1% v/v) con agitación constante. La solución obtenida se dividió en alícuotas de 5 mL que fueron distribuidas en tubos con tapa a rosca y almacenadas en la oscuridad a temperatura ambiente (CLSI, 2013). Mensualmente se controló la absorción a 625 nm, la cual debía estar entre 0.08 y 0.10.

A partir de cada aislamiento inoculado en caldo y en el transcurso de los 15 min posteriores a la preparación, fueron sembradas 2 placas utilizando en cada caso 1 hisopo estéril y atóxico. El hisopo fue introducido dentro de la suspensión y al retirarlo se rotó varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. Para obtener un crecimiento uniforme en la placa de Petri, el hisopo fue deslizado por toda la superficie de la misma en 3 repeticiones rotando la placa 60° cada vez y por último fue deslizado por la periferia del agar. Luego de 3 - 5 min de secado, pero no más de 15 min, se procedió a depositar los discos (CLSI, 2013).

II.4.4. Discos de antibiograma

Los frascos o contenedores de los discos de papel con antibióticos se mantuvieron almacenados en freezer a -20 °C y libres de humedad. Una hora antes de su utilización, fueron llevados a temperatura ambiente. Una vez atemperados y utilizando pinzas estériles, los discos se colocaron sobre la superficie del agar inoculado ejerciendo una leve presión para asegurar el perfecto contacto con el medio de cultivo. Con el objetivo de evitar la superposición de los halos de inhibición, y siguiendo las recomendaciones del CLSI 2013, no se colocaron más de 5 discos en cada placa de Petri de 90 mm de diámetro.

Los discos incluidos en la prueba fueron: penicilina (10 UI), oxacilina (1 µg), clindamicina (2 µg), rifampicina (5 µg), ciprofloxacina (5 µg) de Oxoid, Inglaterra. Cefoxitina (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), azitromicina (15 µg), eritromicina (15 µg), cefoperazona (30 µg), cefalexina (30 µg), enrofloxacin (5 µg), vancomicina (30 µg) de Laboratorio Britania, Argentina.

Una vez colocados los discos de papel con antimicrobiano, y no dejando pasar más de 15 minutos, las placas se colocaron en estufa y se incubaron a 35°C durante 18 h, en posición invertida y apiladas en grupos de cuatro. Pasado ese tiempo, la lectura se realizó con la ayuda de un calibre de Vernier contra un fondo negro e iluminado con luz reflejada (CLSI, 2013).

II.4.5. Lectura e interpretación de los halos de inhibición

Todas las placas fueron leídas por la misma persona y utilizando el mismo calibre de Vernier. Como corresponde cuando se utilizan medios traslúcidos, las placas fueron observadas sobre el reverso y con luz transmitida (CLSI, 2013). Se consideró como zona de inhibición al área circundante a un disco que mostró ausencia de crecimiento visible a simple vista. La interpretación de los resultados de dicha lectura se basó en los datos establecidos en el documento M31-A3 y en el del VET01-S2, para la discriminación de los microorganismos sensibles, intermedios y resistentes (CLSI 2008 y CLSI 2013, respectivamente).

II.4.6. Control de calidad

La cepa de referencia utilizada para supervisar la exactitud del método fue *S. aureus* ATCC 25923 (CLSI, 2013). Al igual que las cepas y aislamientos problema, esta fue mantenida a una temperatura de -70 °C en crioviales con caldo tripticosa soya y 15% de glicerol.

Cada vez que se realizaron estudios de antibiograma, se incluyó a la cepa de referencia entre los aislamientos salvajes evaluados. Dos días antes de realizar los antibiogramas, la cepa fue sembrada en una placa de agar sangre e incubada a 35 °C, durante 18 - 20 h. A partir de este cultivo puro se realizó un repique de 24 h de

incubación que fue utilizado para preparar la suspensión empleada en la placa para antibiograma. Los halos de inhibición de la cepa de referencia fueron comparados con los intervalos que el CLSI 2013 (Tabla 4, documento VET01-S2) determina como aceptables.

Dentro de las novedades más relevantes publicadas en enero de 2013 en el documento M100-S23 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para *Staphylococcus spp.* se eliminaron los criterios de interpretación (puntos de corte) de todos los β -lactámicos a excepción de: penicilina, oxacilina y cefoxitina. Entre los β -lactámicos ahora disponibles, penicilina representa a todas las penicilinas lábiles a penicilinas; oxacilina representa a todas las penicilinas estables a penicilinas; y cefoxitina representa el marcador sustituto de oxacilina.

II.5. Selección de los antimicrobianos a evaluar

De la totalidad de las cepas evaluadas por la prueba de susceptibilidad por antibiograma, se seleccionaron aquellas con las que se continuaron los ensayos encaminados a cumplir los objetivos de esta tesis. La elección de cepas incluyó sensibles a todos los antibióticos (n=3) y con resistencia a β -lactámicos (n=1) y macrólidos (n=3). Esto se debe a que son fenotipos de resistencia frecuentemente observados para *S. aureus* (SARM y MSLB, respectivamente). Los antimicrobianos seleccionados para realizar las pruebas ulteriores fueron: cloxacilina, eritromicina y rifaximina. Los primeros dos antimicrobianos fueron elegidos como representantes de cada uno de los dos grupos de antimicrobianos acción tiempo dependientes y la rifaximina como representante de los antibióticos acción bactericida dependiente de la concentración, según la clasificación basada en pautas farmacocinéticas/farmacodinámicas:

1. Antibióticos acción Tiempo dependientes con escaso/nulo efecto postantibiótico: cloxacilina (β -lactámico).
2. Antibióticos acción Tiempo dependientes con prolongado efecto postantibiótico: eritromicina (Macrólido).

3. Antibióticos acción Concentración dependiente con prolongado efecto postantibiótico: ansamicinas (Rifaximina). Sin embargo, no está del todo clarificado si realmente pertenece a este grupo PK/PD, por lo que es necesario generar información científica al respecto. Además, la rifaximina fue seleccionada por la necesidad de profundizar los conocimientos sobre este antibiótico muy utilizado en el tratamiento de infecciones estafilocócicas. Es una molécula que se encuentra registrada en diversos países de la Comunidad Europea para su uso en infecciones intramamarias de los bovinos, pero la información científica es limitada. Es importante, a su vez, recalcar que este antimicrobiano debe usarse en combinación debido a la facilidad con que se pueden seleccionar resistentes al usarse como monodroga.

II.6. Prueba cuantitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana a los antibióticos

Una vez que las cepas y los antimicrobianos fueron seleccionados, se determinó la CIM mediante microdilución en caldo, metodología basada en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano (CLSI, 2013). Posteriormente se determinó la CBM de los antimicrobianos ensayados.

En el desarrollo de la técnica se prepararon diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2, utilizando como medio de cultivo caldo Mueller Hinton (CMH). Luego, se inoculó dicho medio y tras la correspondiente incubación, para permitir el crecimiento del microorganismo, se realizó la lectura determinando qué concentración causó la inhibición del crecimiento del microorganismo. Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida. La gran cantidad de variables (dependientes del microorganismo, del medio de cultivo, del inóculo) que influyen

en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado finalmente obtenido.

De esta forma se determinaron los valores de CIM para la cepa de referencia, la cepa SARM y para los aislamientos salvajes destinados al estudio. Además de evaluar la sensibilidad de los microorganismos a cada antimicrobiano seleccionado a pH 7.4, que es el habitual del medio reconstituido, se evaluó la modificación o no de la sensibilidad antimicrobiana a pH 6.5 y 5.0, con el fin de emular las condiciones de acidez a nivel subcelular, a las cuales se encuentra enfrentado frecuentemente el *S. aureus*, una vez que ha ingresado al interior celular.

El CMH se preparó siguiendo las especificaciones del fabricante. Este es el medio de cultivo recomendado para las pruebas de susceptibilidad (CLSI, 2013). Para acidificarlo, una vez preparado, se agregaron 3 mL de HCl 1N a un litro de medio de cultivo para llevar a pH 6.5 y 8 mL de HCl 1N a igual volumen de medio de cultivo para obtener un pH 5.0.

II.6.1. Soluciones y diluciones de los antimicrobianos

En la preparación de la solución madre de cada antibiótico, la droga pura, valorada por el fabricante, fue pesada en una balanza analítica y diluida en el volumen necesario del solvente recomendado por la CLSI (2013). Estos solventes se observan en la Tabla 1. Para el cálculo de la concentración se consideró la pureza de la sustancia, con el fin de ajustar la masa de activo a pesar. Aplicamos alguna de las siguientes fórmulas propuestas por la CLSI:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Volumen (mL)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg})}$$

Para cada antimicrobiano se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución stock madre, utilizando los diluyentes recomendados hasta obtener una solución stock de trabajo cuatro veces mayor a la concentración que se deseaba evaluar. Esta solución de trabajo fue el punto de partida para las diluciones seriadas que luego fueron confrontadas con el inóculo bacteriano.

Tabla 1. Solventes y diluyentes empleados para la preparación de las soluciones stock de Cloxacilina, Eritromicina y Rifaximina.

ANTIMICROBIANO	SOLVENTE	DILUYENTE
CLOXACILINA	METANOL	MEDIO DE CULTIVO/AGUA
ERITROMICINA	ETANOL 95%	MEDIO DE CULTIVO/AGUA
RIFAXIMINA	METANOL	MEDIO DE CULTIVO/AGUA

II.6.2. Procedimiento

El valor que se obtiene de la CIM por el método de dilución es un valor que orienta (no es un valor real) acerca de cuál es la concentración necesaria en el sitio de infección para que un microorganismo dado pueda inhibirse. La CIM puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo de este (CLSI, 2013).

Para la prueba de sensibilidad por microdilución para cada antimicrobiano y para cada cepa y aislamiento salvaje, se emplearon policubetas descartables estériles de 96 pocillos con fondo en “U”. Cada una de las policubetas contenía el rango completo de diluciones del antimicrobiano, repetido cuatro veces, la serie total de concentraciones evaluadas comprendía dos filas de la policubeta para cada microorganismo, desde la columna 1 a la 10. La columna 11 contenía el inóculo sin antimicrobiano ni inhibidor, permitiendo de esta manera tener un control positivo de crecimiento y la columna número 12 fue el control negativo, pues solo contenía caldo (Figura 7). Este procedimiento se realizó por duplicado y para los pH 7.4, 6.5 y 5.0.

Las policubetas fueron cargadas con 100 μ L de CMH utilizando una pipeta multicanal. Luego los primeros pocillos de cada fila se cargaron individualmente con 100 μ L del antimicrobiano a una concentración cuatro veces mayor que la deseada para dicho pocillo. Es decir, que al agregar 100 μ L de la solución stock de trabajo concentrada al caldo, se obtuvo una dilución 1:2 y una vez realizada, las diluciones seriadas desde la columna 1 hasta la 10 con la pipeta multicanal el volumen volvió a quedar en 100 μ L. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de caldo conteniendo el inóculo problema, diluyendo de esta manera, la concentración anterior, nuevamente 1:2. En consecuencia, la concentración final resultó ser cuatro veces menor que la preparada inicialmente. Una vez cargado el inóculo, el volumen final por pocillo fue de 200 μ L.

En el caso de la cloxacilina, el CMH fue suplementado con 2% de cloruro de sodio por recomendación de la CLSI para penicilinas resistentes a penicilinasas.

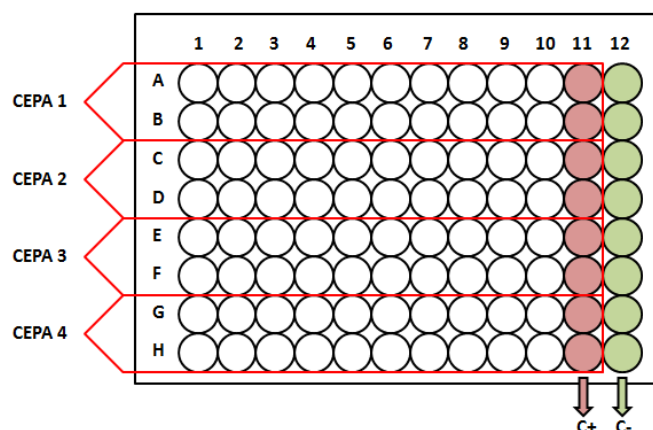


Figura 7. Esquematación de policubetas para la realización de las CIMs de los antimicrobianos por microdilución. *C+*: control positivo, *C-*: control negativo.

II.6.3. Preparación de las soluciones de trabajo de los antimicrobianos

Para cada antimicrobiano se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución stock madre, utilizando los diluyentes recomendados hasta obtener una solución stock de trabajo cuatro veces mayor a la concentración que se deseaba evaluar. Esta solución de trabajo fue el punto de partida para las diluciones seriadas que luego fueron confrontadas con el inóculo bacteriano.

Diluciones seriadas de cloxacilina

Se empleó cloxacilina en forma benzatínica, cuya potencia era de 96.4% p/p (Vetpharma Animal Health S.L.) cedida por Biogénesis Bagó. La solución stock madre (5120 µg/mL) se preparó usando como solvente metanol calidad HPLC. A partir de ésta, se prepararon dos diluciones: la mayor (1024 µg/mL), fue la primera concentración de las filas A, C, E y G de la policubeta y la menor (16 µg/mL), la primera de las B, D, F y H, lo cual permitió obtener un rango de diluciones más amplio. Cada una de estas, contenía cuatro veces la concentración más alta a analizar y los diluyentes empleados fueron primero agua y luego CMH en ambos casos.

Para las filas A, C, E y G la primera dilución fue de 1024 µg/mL con el fin de lograr una concentración final de 256 µg/mL en el primer pocillo. El rango de diluciones seriadas fue: 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL y 0.5 µg/mL del antimicrobiano.

La segunda concentración, para las filas B, D, F y H fue de 16 µg/mL y el rango obtenido fue: 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL, 0.062 µg/mL, 0.031 µg/mL, 0.015 µg/mL y 0.007 µg/mL de cloxacilina.

En consecuencia, para cloxacilina el rango de diluciones seriadas comprendió concentraciones desde 256 µg/mL hasta 0.007 µg/mL.

Diluciones seriadas de eritromicina

Se empleó eritromicina en forma de base con 90.7 % p/p de pureza (Parafarm). El solvente utilizado para la preparación de la solución madre fue etanol 95% y las soluciones stock de trabajo se diluyeron en CMH. En este caso particular las CIMs de los aislamientos salvajes resistentes y sensibles fueron analizadas con rangos de diluciones levemente diferentes debido a que las primeras no fueron inhibidas a la concentración más elevada utilizada para las sensibles.

Para las sensibles a eritromicina el rango fue de 256 µg/mL a 0.007 µg/mL coincidiendo con el caso anterior, mientras que, en el caso de las resistentes a eritromicina, las concentraciones evaluadas en la primera fila fueron: 1024 µg/mL,

512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL y 2 µg/mL del antimicrobiano. La segunda fila fue igual al caso de la cloxacilina. Por lo tanto, el rango cubierto para los aislamientos salvajes resistentes fue de 1024-0.007 µg/mL.

Diluciones seriadas de rifaximina

La solución stock madre se preparó utilizando rifaximina potencia >99% p/p (Santa Cruz Biotechnology). Se empleó metanol como solvente y CMH como diluyente. La técnica fue idéntica a la explicada para cloxacilina, obteniendo también un rango de diluciones comprendido entre 256 µg/mL y 0.007 µg/mL.

Preparación del inóculo

Para la prueba de susceptibilidad bacteriana por microdilución, se preparó el inóculo bacteriano de los aislamientos problema y de las cepas de referencia por método directo a partir de colonias aisladas (CLSI, 2013).

El inóculo se preparó de forma similar a la descrita en el punto II.4.3, realizando una suspensión de colonias en solución salina estéril, provenientes de un cultivo en medio no selectivo de 24 h a 35 °C. La densidad de dicha suspensión fue ajustada a la escala 0.5 de McFarland, es decir, 1 a 2×10^8 UFC/mL para *S. aureus* ATCC 29213.

Para la preparación del inóculo final de la cepa de referencia y los aislamientos salvajes analizados, se diluyó 1:100 la suspensión inicial obtenida, es decir en 9.9 mL de CMH se colocaron 100 µL del inóculo inicial obteniendo 10^6 UFC/mL. Luego se colocaron 100 µL de esta última en cada pocillo de la policubeta previamente cargada con antimicrobiano y caldo (100 µL). De este modo, se obtuvo una dilución 1:2 logrando así un inóculo final de 5×10^5 UFC/mL.

La suspensión bacteriana finalmente obtenida, fue colocada con ayuda de una pipeta multicanal a razón de 100 µL/pocillo de cada policubeta dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación (CLSI, 2013).

Incubación de las placas e interpretación de resultados

Luego de haber colocado el inóculo, se procedió a la incubación de las placas en estufa a 35 °C durante 20 h, apiladas en grupos de a cuatro y cubiertas con tapa plástica para evitar su desecación (CLSI, 2013).

La determinación de la CIM fue realizada a simple vista obteniendo como punto final al primer pocillo que presentó falta de turbidez. Cada pocillo con turbidez evidente fue comparado con la columna de control positivo, es decir aquella que contenía caldo e inóculo sin antimicrobiano. De este modo, se consideró válido solo cuando se observó un botón de crecimiento >2mm de diámetro o turbidez neta (CLSI, 2013).

La interpretación de los resultados de dicha lectura se basó en los datos establecidos en el documento M31-A3 (CLSI 2008), VET01-S2 (CLSI 2013) y en el del M100-S23 (CLSI 2013), para la discriminación de los microorganismos sensibles, intermedios y resistentes.

El control de calidad de este método se llevó a cabo, siguiendo las recomendaciones de la CLSI 2013 con la cepa *S. aureus* ATCC 29213, a diferencia del método de antibiograma donde se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

II.6.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el uso del análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer con el nivel de significancia establecido en $p < 0.05$.

II.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana del AE

Para determinar la CIM del AE frente a las cepas de referencia, SARM y aislamientos salvajes seleccionados de *S. aureus*, también se utilizó el método de microdilución en caldo, de acuerdo con lo descrito en el documento CLSI 2013 (VET01-S2). La técnica empleada fue similar a la detallada anteriormente para los antibióticos (cloxacilina, eritromicina y rifaximina) con algunas modificaciones. El medio de cultivo utilizado fue el CMH, al cual se le adicionó 0.5% v/v de Tween 80.

Este surfactante favorece la disolución del AE en el medio de cultivo acuoso. La CIM del AE fue evaluada también a pH 7.4, 6.5 y 5.0. Este ajuste en la acidez del medio se llevó a cabo con HCl 1N como se explicó en el punto II.6.

II.7.1. Solución de trabajo de AE

La solución madre de AE se preparó siempre en el momento en que se iba a utilizar. Esta solución tenía una concentración cuatro veces mayor a la que se deseaba evaluar y fue el punto de partida para las diluciones seriadas que luego fueron confrontadas con el inóculo bacteriano.

Se evaluó un solo rango de concentraciones por placa, siendo diluciones seriadas a la mitad desde el pocillo 1 al 10. La primera dilución fue de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, por lo tanto, la solución madre se preparó a una concentración de 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Esta se formuló con CMH, 0.5% de Tween 80 y AE en forma pura. El rango de diluciones seriadas fue: 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 6.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 3.12 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 1.56 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 0.78 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 0.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 0.19 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 0.09 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del AE.

II.7.2. Procedimiento

Las policubetas se cargaron con 100 μL de CMH con 0.5% v/v de Tween 80 utilizando una pipeta multicanal. Luego los primeros pocillos de cada fila se cargaron individualmente con 100 μL del AE, a una concentración cuatro veces mayor que la deseada para dicho pocillo. Es decir, que al agregar 100 μL de la solución stock de trabajo concentrada al caldo, se obtuvo una dilución 1:2 y una vez realizada, las diluciones seriadas desde la columna 1 hasta la 10, con la pipeta multicanal, el volumen volvió a quedar en 100 μL . Posteriormente, se agregaron 100 μL de caldo conteniendo el inóculo problema, diluyendo de esta manera, la concentración anterior, nuevamente 1:2. En consecuencia, la concentración final resultó ser cuatro veces menor que la preparada inicialmente. Una vez cargado el inóculo, el volumen final por pocillo fue de 200 μL .

Preparación del inóculo

Al igual que fue descrito en el punto II.4.3 el inóculo se preparó realizando una suspensión de colonias, en solución salina estéril, provenientes de un cultivo en medio no selectivo de 24 h a 35 °C. La densidad de dicha suspensión fue ajustada a la escala 0.5 de McFarland, es decir, $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL para *S. aureus* ATCC 29213.

Para la preparación del inóculo final de cada cepa y aislamiento analizados, se diluyó 1:100 la suspensión inicial obtenida, a 9.9 mL de CMH suplementado con Tween 80 al 0.5% v/v se le adicionaron 100 μ L del inóculo inicial, obteniendo 10^6 UFC/mL. Luego se colocaron 100 μ L de esta última en cada pocillo de la policubeta previamente cargada con AE y caldo (100 μ L). De este modo, se obtuvo una nueva dilución 1:2 logrando así un inóculo final de 5×10^5 UFC/mL.

La suspensión bacteriana finalmente obtenida, fue colocada con ayuda de una pipeta multicanal a razón de 100 μ L/pocillo de cada policubeta dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación (CLSI, 2008).

Incubación de las placas e interpretación de resultados

Posteriormente a la colocación del inóculo, se procedió a la incubación de las placas en estufa a 35 °C durante 20 h, apiladas en grupos de a cuatro y cubiertas con tapa plástica para evitar su desecación (CLSI, 2013).

La determinación de la CIM fue realizada a simple vista obteniendo como punto final al primer pocillo que presentó falta de turbidez. Cada pocillo con turbidez evidente fue comparado con la columna de control positivo, es decir aquella que contenía caldo e inóculo sin AE. De este modo, se consideró válido solo cuando se observó un botón de crecimiento >2 mm de diámetro o turbidez neta (CLSI, 2013).

El control de calidad de este método se llevó a cabo, siguiendo las recomendaciones de la CLSI 2013 con la cepa *S. aureus* ATCC 29213, a diferencia del método de antibiograma donde se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

II.7.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el uso del análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer con el nivel de significancia establecido en $p < 0.05$.

II.8. Evaluación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los antibióticos y del AE

La concentración bactericida mínima (CBM), se define como la mínima concentración de antibacteriano capaz de producir la muerte de la mayoría de los organismos viables (> 99.9%) después de 24 h de incubación bajo condiciones estandarizadas (NCCLS, 1999). Esta determinación está sujeta a variables metodológicas por lo cual se utiliza como un complemento de los datos obtenidos por la CIM, pero con una relevancia clínica prácticamente imposible de apreciar, fundamentalmente para ciertos fármacos y en determinadas circunstancias.

Procedimiento

Para la determinación de la CBM se utilizó el método de microdilución, mediante el empleo de policubetas estériles de 96 pocillos, fondo en "U", conteniendo un volumen final de 200 μ L de caldo. Según menciona la CLSI en su documento M26-A Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents (NCCLS, 1999) una ventaja de la determinación por microdilución es que no se ha encontrado que la adherencia de los microorganismos a las paredes de los pocillos sea un problema, a diferencia de lo que se observa cuando se usan tubos de plástico en la macrodilución.

El procedimiento básico se realizó, según fue descrito para la CIM en los apartados 6.2 (antibióticos) y 7.2 (AE), por microdilución en CMH para las cepas de referencia, SARM y los aislamientos salvajes.

Partiendo de la policubeta donde fue determinada la CIM, tras 24 h de incubación, y luego de la lectura del resultado de esta última, se tomaron alícuotas de los pocillos que no presentaban turbidez apreciable a simple vista ni un botón

de precipitado en el fondo. Es decir, que fueron muestreadas las cubetas que contenían concentraciones mayores al valor establecido como CIM.

Se tomaron 50 μL de cada pocillo y se sembró uniformemente en una placa con agar MH, luego se incubó 24 h a 35 °C a fin de determinar el número de bacterias viables remanentes, método recomendado por la CLSI (NCCLS, 1999). Este procedimiento se realizó por duplicado.

Lectura e interpretación

El punto final letal es determinado por un subcultivo cuantitativo usando una pipeta calibrada. Cada pocillo que mostró inhibición de crecimiento a las 24 h fue subcultivado en una placa de agar MH. Considerando que el inóculo final en la prueba de la CIM fue de 5×10^5 UFC/mL, y teniendo en cuenta que la CBM se define como la muerte del 99.9% de las bacterias presentes en el mismo, las placas que presentaron 500 UFC/mL o menos, fueron las que representaron la concentración bactericida mínima del antimicrobiano evaluado o del AE de *M. armillaris*. Este valor de 500 UFC/mL se correlaciona con el conteo de 25 colonias en la placa, dado que se siembran 50 μL (NCCLS, 1999).

II.8.1. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el uso del análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer con el nivel de significancia establecido en $p < 0.05$.

II.9. Determinación de actividad antimicrobiana AE/antibiótico

Se evaluaron, en placas de microtitulación de 96 pocillos conteniendo CMH suplementado con Tween 80 al 0.5% a pH 7.4; 6.5 y 5.0, combinaciones del antibiótico y del extracto vegetal frente a los aislados de *S. aureus* y a la cepa de referencia mediante la técnica de tablero de damas o checkerboard (Eliolopus y Moellering, 1996). La preparación del medio de cultivo incluyó también la adición de Tween 80 para permitir la disolución del aceite y para la acidificación del medio

se utilizó HCL 1N. El procedimiento utilizado fue similar al empleado para evaluar la CIM de los antibióticos y del AE. En el caso de la combinación del AE con cloxacilina, el CMH fue suplementado con 2% de cloruro de sodio por recomendación de la CLSI para penicilinas resistentes a penicilinasas.

II.9.1. Procedimiento

El rango de concentraciones evaluadas fue establecido en base a los valores de CIM obtenidos por antimicrobiano y por pH.

Para el AE las concentraciones evaluadas fueron de 50-0.19 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Los rangos de concentración utilizados para los antibióticos se muestran en la tabla 2.

En este ensayo las placas de microtitulación se armaron de modo que la columna 12 representaba el control de esterilidad (negativo) y la columna 11 el control de crecimiento (positivo) al igual que para la determinación de la CIM. Se incluyó el control de CIM para el antibiótico en diluciones seriadas a la mitad en los pocillos (1B a 1H). De la misma manera para el AE, pero en la fila A (2A a 10A). Las combinaciones de estos se ubicaron en el rectángulo comprendido entre 2B-2H y 10B-10H (Figura 8).

Tabla 2. Concentraciones de rifaximina, eritromicina y cloxacilina utilizadas para realizar el tablero de damas frente a cepas y aslamientos sensibles y resistentes.

Antibiótico	pH	Rango de concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Rifaximina sensibles	7.4	0.064 - 0.001
	6.5	0.064 - 0.001
	5.0	0.064 - 0.001
Eritromicina sensibles	7.4	4 - 0.125
	6.5	4 - 0.125
	5.0	16 - 0.5
Eritromicina resistentes	7.4	1024 - 16
	6.5	1024 - 16
	5.0	1024 - 16
Cloxacilina sensibles	7.4	2 - 0.031
	6.5	1 - 0.015
	5.0	0.125 - 0.002
Cloxacilina resistente	7.4	512 - 8
	6.5	512 - 8
	5.0	8 - 0.125

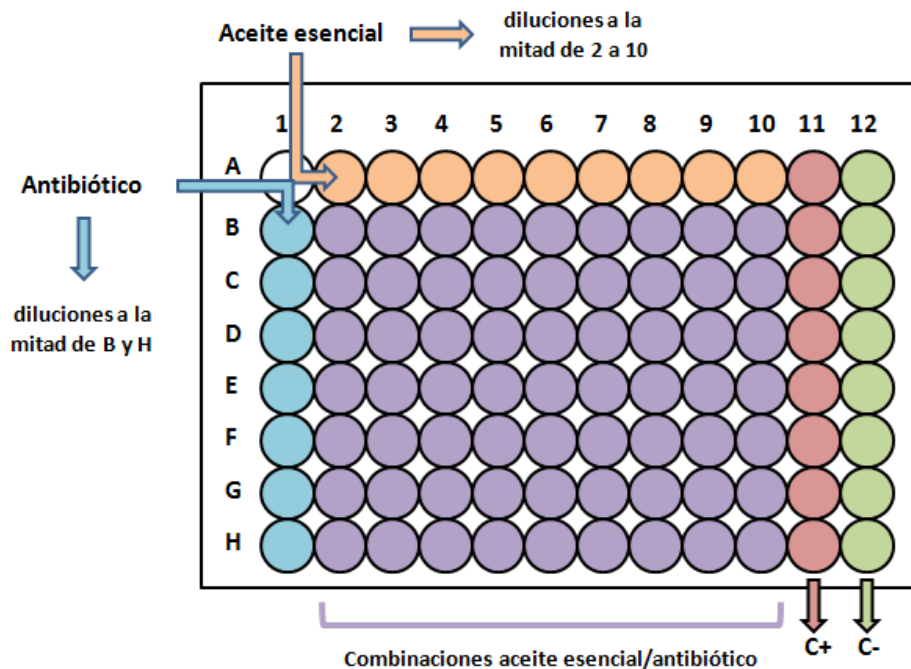


Figura 8. Esquema de armado de tablero de damas.

Se prepararon dos placas (duplicado) por cepa de referencia, SARM o aislamiento salvaje, antibiótico y condición de pH. La preparación de las mismas involucró inicialmente la carga de 100 μL de CMH con 0.5% de Tween 80 en las columnas 1 a 10, 150 μL en la columna 11 y 200 μL en la 12. Luego, se agregaron 100 μL (en toda la columna 2) de AE de una solución stock de 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$, preparada como se explicó en 7.1, de modo que la concentración final fuese 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ por la dilución 1/4 que se generó en el proceso (ver rangos utilizados en tabla 2). Al igual que en el proceso de determinación de CIM, se distribuyeron 100 μL desde la columna 2 a la 10, con descarte de este volumen en la última columna, luego de homogeneizar. En toda la fila A (2A-10A) se agregaron 50 μL de CMH con 0.5% de Tween 80 para tener un volumen de 150 μL .

Posteriormente se cargó el antibiótico. A todos los pocillos de cada fila (de B a H) se le agregaron 50 μL de solución stock de antimicrobiano (de igual forma que en el punto 6.3), preparada con una concentración 4 veces superior a la deseada por fila, ya que se adicionan 50 μL en 200 μL totales. De este modo todos los

pocillos, excepto los de la columna 12, contenían 150 µL. El volumen restante para llegar a los 200 µL fue de inóculo. La solución bacteriana se estandarizó a una concentración de 2×10^6 UFC/mL.

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó partiendo de una concentración bacteriana comparable con el 0.5 de la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL). La preparación del inóculo se realizó de forma similar a la mencionada en los puntos 6.3 y 7.2, pero con la dilución 1/50 del tubo 0.5 McFarland.

Incubación de las placas e interpretación de resultados

Se llevó a cabo la incubación en las mismas condiciones que las mencionadas en los puntos 6.3 y 7.2. El control de calidad de este método se llevó a cabo con la cepa *S. aureus* ATCC 29213 al igual que las determinaciones individuales de CIM. Se corroboró que los valores de concentraciones inhibitorias de los antibióticos y del AE, individualmente en las placas, se correspondiesen con el resultado obtenido anteriormente en los puntos 6 y 7.

La interpretación de los resultados se realizó a través del cálculo del índice de la concentración fraccionaria inhibitoria (CFI) según la siguiente fórmula:

$$CFI = \frac{(A)}{(CIM)_a} + \frac{(B)}{(CIM)_b}$$

Los criterios para la interpretación de los resultados se basaron en una combinación de los propuestos por Berenbaum (1978) y Eliopoulos (1989). Se consideró sinergismo (S) si $CFI \leq 0.5$; sinergismo parcial o bajo (SP) si $0.5 < CFI < 1$; indiferencia o adición (I) si $1 \leq CFI < 2$ y antagonismo (A) cuando $CFI \geq 2$.

Cuando el valor de CIM del fármaco individual y en la combinación, coincidió con el valor extremo del rango de concentración probado, el valor del índice CFI se consideró igual a uno (producto del resultado de dividir el mismo valor en la fórmula). En estos casos, la combinación se declaró indiferente o antagónica, según el valor de la sumatoria total del índice CFI obtenido para la combinación investigada. Como punto final en cada prueba se consideró aquella combinación

antibiótico/AE a la cual se produjo la máxima interacción sinérgica, es decir, aquella que expresó el menor valor del índice CFI, siempre que ninguna de las restantes fuera antagónica.

II.10. Ensayo de curva de muerte o letalidad bacteriana

Se realizó la curva de letalidad o muerte bacteriana, gráfico resultante del estudio de la actividad letal expresada como el Logaritmo en base 10 de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (Log_{10} UFC/mL) a una concentración fija de antimicrobiano bajo condiciones controladas en el tiempo.

Se determina contando el número de células viables a diferentes intervalos de tiempo. Se valora la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano. Este método es particularmente útil para evaluar la cinética de muerte de un agente antimicrobiano. La técnica consiste en enfrentar un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo de cultivo, en comparación con un control sin antibiótico (curva de crecimiento control). Nos permite determinar el porcentaje de muerte bacteriana alcanzado por una concentración fija de antimicrobiano bajo condiciones controladas. Este porcentaje de muerte se determina midiendo el número de células viables (unidades formadoras de colonias -UFC-) a diferentes intervalos de tiempo como mencionamos. El poder bactericida se establece cuando se produce una disminución de las UFC en 3 logaritmos decimales en un tiempo determinado.

Las curvas de muerte bacteriana se llevaron a cabo tomando como punto de partida los resultados obtenidos en la determinación de las CIMs de los antimicrobianos (puntos 6 y 7) y se utilizaron las mismas variables de pH, tipo de antibiótico, presencia de AE y combinación de ambos.

II.10.1. Procedimiento

Para cada combinación microorganismo/antimicrobiano, se empleó una batería de tubos conteniendo un volumen final de 1mL constituido por CMH, inóculo y cada una de las concentraciones del antimicrobiano a evaluar, según se

describe a continuación. En las pruebas en que se utilizó AE solo o en combinación se adicionó 0.5% Tween 80 al caldo.

El procedimiento se realizó para cada cepa de referencia, SARM y aislamiento salvaje en presencia de antibiótico, AE y la mezcla de ambos. Cada ensayo se llevó a cabo a pH 7.4, a pH 6.5 y a pH 5. El ajuste del pH se realizó con HCl 1N como se indicó anteriormente. El procedimiento se realizó por triplicado para cada cepa, condición de pH y antimicrobiano.

Cada batería estuvo conformada por 5 tubos de vidrio conteniendo concentraciones del antimicrobiano en cuestión (antibiótico, AE o la combinación), correspondientes a 0.5 CIM, 1 CIM, 2 CIM, 4 CIM y 8 veces la CIM. Un sexto tubo, sin antimicrobiano, fue usado como control del crecimiento bacteriano.

El inóculo bacteriano se enfrentó a los antimicrobianos o al AE (por separado y/o combinados) a diferentes concentraciones y a determinados intervalos de tiempo (0, 2, 4, 8, 12 y 24 h), se tomaron submuestras de cada uno de los tubos de las baterías y se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en placas de Petri con AMH. El inóculo inicial por tubo fue de 5×10^5 UFC/mL. Las muestras tomadas a cada tiempo fueron diluidas en forma seriada según el crecimiento observado a modo de poder contabilizar entre 10 y 300 colonias por placa. Para ello, las submuestras se prepararon tomando 10 μ L de cada tubo y se diluyeron en 90 μ L de solución fisiológica estéril, a partir de esta primera dilución se realizaron diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc) para luego sembrar en las placas 10 μ L de cada dilución a fin de poder realizar el conteo de colonias en la placa.

Cada placa se incubó a 35 °C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se procedió a realizar la lectura con el consiguiente conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) a fin de observar el efecto del antimicrobiano sobre la cepa o aislamiento salvaje analizado. El límite de detección para esta prueba fue de 10 UFC/mL.

Preparación de tubos con antibióticos, AE y combinaciones de ambos

Los tubos en los que se evaluó la actividad antimicrobiana de los antibióticos (cloxacilina, rifaximina y eritromicina) se prepararon con un volumen final de 1 mL, conteniendo 800 μL de CMH, 100 μL de antibiótico a una concentración 10 veces mayor a la deseada en el tubo (se produce una dilución 1/10 en la carga) y 100 μL de inóculo 5×10^6 UFC/mL (finalmente se obtiene una concentración de 5×10^5 UFC/mL). Las concentraciones de cada antibiótico utilizadas en cada tubo se presentan en la tabla 2 (seleccionadas a partir de la determinación de la CIM en el punto 6). Las soluciones stock de antibiótico fueron preparadas según lo desarrollado en el punto 6.3, donde la cloxacilina y rifaximina fueron disueltas en metanol calidad HPLC y la eritromicina en etanol 95%. Luego fueron diluidas en CMH hasta alcanzar la concentración de carga de cada tubo (10 veces mayor a la final por tubo).

En el caso del AE, la cantidad de caldo utilizado en cada tubo dependía de la concentración deseada, debido a que la esencia se encuentra en estado líquido. Esto facilitó la preparación al no hacer una solución stock, sino adicionándolo directamente al tubo. Luego se agregó CMH al 0.5% en Tween 80 en un volumen necesario para obtener 900 μL . Por último, se agregó el inóculo de igual forma que la utilizada para los antibióticos (100 μL de inóculo 5×10^6 UFC/mL) pero preparado en CMH al 0.5% en Tween 80. Las concentraciones 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM son aquellas obtenidas para determinar la CIM, como se describe en el punto II.7.

Finalmente, para las combinaciones AE/antibiótico se partió de aquellas combinaciones que arrojaron los menores valores de CFI, tomadas como valor CIM de las mezclas obtenidas en el punto 9. Para ello se prepararon 6 tubos con 1 mL de volumen final conteniendo la mezcla AE/antibiótico. Estos se correspondían con el control sin antimicrobianos; 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM de la mezcla. La preparación de los tubos se llevó a cabo cargando el volumen de AE necesario para obtener la concentración deseada en un volumen final de 1 mL. Luego, se agregó CMH al 0.5% en Tween 80 en cantidad necesaria para llegar a 800 μL . Se agregaron 100 μL correspondientes al antibiótico, nuevamente 10 veces más concentrado

que lo que se deseaba en el tubo final. Las diluciones del antibiótico fueron preparadas en CMH al 0.5% en Tween 80 a partir de la solución stock correspondiente. Por último, se agregaron los 100 μL de inóculo 5×10^6 UFC/mL también preparado en CMH al 0.5% en Tween 80.

Preparación del inóculo

El inóculo bacteriano de los aislamientos salvajes problema y de las cepas de referencia y SARM fueron preparados de acuerdo con el documento M26-A *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents* (CLSI, 1999), incorporando a cada tubo de las baterías una concentración constante de UFC/mL.

Partiendo de una placa de agar de 24 h, se tomó con ansa un promedio estimado de 2-4 colonias, de cada cepa o aislamiento salvaje en estudio, que luego se inocularon en un tubo de vidrio conteniendo 5 mL de solución fisiológica estéril comparando la turbidez con la escala 0.5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Posteriormente, se realizó una dilución 1:20 logrando una suspensión bacteriana de 5×10^6 UFC/mL. De esta suspensión se inocularon 100 μL en cada tubo a modo de lograr una concentración de 5×10^5 UFC/mL en el tubo final, cuyo volumen final era de 1 mL (se obtiene la última dilución 1/10 al sembrar el inóculo). El tubo 5 fue el único que contenía inóculo bacteriano sin antibiótico ni AE.

Los tubos fueron homogenizados por agitación antes de cada siembra con el fin de re-suspender las bacterias que quedasen adheridas a las paredes del mismo.

Lectura e interpretación

La lectura de las placas se realizó contando las colonias (UFC) a ojo desnudo. Con los datos obtenidos corregidos por los factores de dilución, se graficó el logaritmo de las UFC en función del tiempo. Para graficar las curvas de muerte bacteriana se utilizaron las medias de las replicas realizadas (triplicados en todos los casos, excepto al evaluar eritromicina y combinaciones AE-eritromicina que fueron duplicados). Se consideró efecto bactericida del antimicrobiano (utilizado solo) cuando se logró una disminución de 3 Log_{10} (99.9 % de muerte bacteriana)

de UFC/mL en el tiempo evaluado. Mientras que para evaluar el efecto sinérgico de la combinación AE/antibiótico, nos basamos en la CLSI que estipula que el efecto bactericida en una combinación sinérgica se manifiesta como una disminución de 2 Log₁₀ de UFC/mL.

II.10.2. Evaluación del índice de actividad antibacteriana

El índice de actividad antibacteriana (E) se cuantificó como la diferencia entre los valores Log₁₀ del número de bacterias viables (UFC/mL) al inicio (nt-0) y al final del ensayo (nt-24) según la siguiente ecuación: $E = nt-24 - nt-0$.

Para evaluar E, se aplicaron tres puntos de corte teóricos (Sidhu y col., 2010): a) Efecto bacteriostático: $E = 0$; no hay cambios en el valor de nt-0; b) Efecto bactericida: $E = -3$; hay reducción de ≥ 3 Log₁₀ de nt-0 y c) Efecto de erradicación virtual de bacterias: $E = -4$; hay reducción de ≥ 4 Log₁₀ (99.99%) respecto del Log₁₀ de nt-0.

Los resultados obtenidos fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism 6 a fin de obtener curvas E vs. Log₁₀ (concentración del antibiótico), utilizando las medias de los replicados descriptos anteriormente.

II.10.3. Modelización matemática de las curvas de crecimiento, muerte bacteriana y efecto antibacteriano

Con los datos obtenidos en la construcción de las curvas de crecimiento y muerte bacteriana de *S. aureus* en las diferentes condiciones (pH 7.4, 6.5 y 5.0, en ausencia y presencia de antibióticos, AE y sus combinaciones) se llevó a cabo la modelización matemática de los mismos. La microbiología predictiva es una poderosa herramienta para cuantificar y predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos bajo diversas condiciones. Entre los muchos factores que afectan el crecimiento microbiano, en nuestro caso evaluamos el pH del medio, la acción de antimicrobianos y el tiempo de exposición a los mismos. En estos casos, son de gran utilidad los modelos cinéticos, que explican el tiempo necesario para obtener una respuesta específica de crecimiento o muerte en términos de variables

como temperatura, pH y propiedades antimicrobianas. Los modelos cinéticos son útiles para predecir cambios en los recuentos microbianos con el tiempo. El modelo cinético de Gompertz es de gran utilidad y permite describir grados de respuesta, como la velocidad de crecimiento específica (μ), el tiempo de latencia (LPD) y la máxima densidad de población (MPD) (Whiting y Buchanan, 1994; Zwietering y col., 1990). Para analizar las curvas de crecimiento de *S. aureus*, aplicamos el modelo de Gompertz, cuya expresión matemática es:

$$\text{Log } N = a + c \cdot \exp(-\exp(-b(t-m)))$$

Donde $\text{Log } N$ es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos (Log_{10} UFC/mL) al tiempo t , dado en horas; a es el Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente (aproximadamente equivale al Log_{10} de los niveles iniciales de bacterias) (Log_{10} UFC/mL); c es el Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (es el número de ciclos Log de crecimiento) (Log_{10} UFC/mL); m es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (horas); b es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo m (h^{-1}).

De estos parámetros, se derivan la velocidad específica de crecimiento ($\mu = b \cdot c / e$) (Log_{10} UFC/mL*horas), (con $e = 2.7182$), la duración de la fase de latencia (LPD = $m - 1/b$) (horas) y la máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares (MPD = $a + c$) (Log_{10} UFC/mL).

Estos parámetros son específicos para cada microorganismo y su ambiente. La ecuación fue ajustada a los datos del desarrollo microbiano mediante una regresión no lineal con el programa Sigma Plot (Sigma Plot 12.0, 2011), ya que los parámetros de la curva de Gompertz son no lineales.

El software ajusta los datos a la curva, es decir calcula los parámetros de acuerdo con un determinado criterio. Los parámetros a , c , b y m son estimados, para obtener un modelo matemático completo del cual una curva de crecimiento podría ser predicha para cualquier combinación de condiciones dentro de los

límites del experimento. Otros parámetros de interés como la fase de latencia pueden derivarse entonces de la curva de predicción.

En el caso de las curvas donde se observó muerte bacteriana, los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo fueron ajustados con un modelo sigmoideo menos base:

$$N = N_0 - (N_{max} \cdot T^\gamma) / (T_{150}^\gamma + T^\gamma)$$

Donde N es el número de UFC/mL a un tiempo determinado, N_0 es la concentración del inóculo inicial, N_{max} es la máxima caída de recuento bacteriano, T_{150} es el tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima, γ es el coeficiente de sigmoidicidad y T es el tiempo. Los datos experimentales fueron ajustados con los modelos de regresión no lineal de mínimos cuadrados empleando el programa informático Sigma Plot (Sigma Plot 12.0, 2011).

Por último, aplicamos el modelo sigmoideo, que es análogo al de respuesta máxima o de Hill (Weidmann y Dell' Elce, 2017), a los valores de índice E vs. concentración de antimicrobiano, a fin de poder comprender la mecánica de la relación entre la concentración de estos y su efecto bactericida, y así poder obtener más información acerca del comportamiento de *S. aureus* en las diferentes condiciones evaluadas. Redefiniendo la ecuación anterior tenemos que:

$$E = E_0 - (E_{max} \cdot T^\gamma) / (C_{150}^\gamma + T^\gamma)$$

Donde E es el índice E (Log_{10} UFC/mL) a una concentración determinada, E_0 es el índice E en ausencia de antimicrobiano (Log_{10} UFC/mL), E_{max} es la máxima reducción en Log_{10} del E_0 , C_{50} es la concentración que causa el 50% de la reducción de E_{max} , γ es el coeficiente de sigmoidicidad y T es el tiempo. Los datos experimentales fueron ajustados con los modelos de regresión no lineal de mínimos cuadrados empleando el programa informático Sigma Plot (Sigma Plot 12.0, 2011).

De este modo, con la modelización de los diferentes datos pudimos estimar para las condiciones evaluadas (diferentes valores de pH y presencia/ausencia de

AE): la velocidad de crecimiento bacteriano en función del tiempo en ausencia y concentraciones subinibitorias de los antimicrobianos, la evolución de la población bacteriana en función del tiempo respecto de una concentración fija de antimicrobiano y la relación efecto antibacteriano versus concentración antibiótica. Con estas estimaciones se puede observar con mayor detalle el efecto del cambio de pH y la interacción entre el AE de *M. armillaris* y los tres antibióticos evaluados.

II.10.4. Análisis estadístico

Los valores del parámetro C_{50} de la modelización matemática del Índice E para cada antimicrobiano se compararon a los 3 pHs mediante el uso del análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer con el nivel de significancia establecido en $p < 0.05$. Por otro lado, el parámetro C_{50} de cada antibiótico fue comparado con el mismo parámetro obtenido en las combinaciones con AE mediante la prueba t para datos no apareados con el nivel de significancia establecido en $p < 0.05$.

II.11. Evaluación de citotoxicidad del AE de *M. armillaris* sobre PMNs

Para poder establecer el efecto del AE en la viabilidad de las células PMNs, se llevó a cabo el aislamiento de este tipo celular a partir de sangre bovina. Posteriormente se enfrentaron los cultivos celulares a distintas concentraciones del AE para evaluar la viabilidad de estos frente al extracto vegetal.

II.11.1. Separación de PMNs de sangre bovina

Se aislaron células polimorfonucleares a partir de sangre bovina, los cuales fueron resuspendidos en medio RPMI 1640, hasta alcanzar una concentración de 5×10^6 /mL. Para ello, en un tubo cónico de vidrio estéril, se colocaron 3 mL de histopaque 1077, luego sobre este último, se agregaron 3 mL de sangre bovina completa, heparinizada, teniendo cuidado de no mezclar la sangre con el reactivo. La sangre se obtuvo de bovinos sanos que no hubiesen recibido tratamiento

antimicrobiano alguno durante los últimos 3 meses antes del inicio del ensayo. El protocolo fue aprobado por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (47.3.15J).

Centrifugamos durante 30 min a 400 g, así las células de la serie granulocítica se ubicaron entre el histopaque 1077 y los globulos rojos (ubicados en el fondo del tubo), mientras que los linfocitos, otras células mononucleares y las plaquetas se ubicaron en la zona entre el plasma y el histopaque 1077.

Retiramos suavemente con una pipeta pasteur estéril las capas superiores dejando la zona correspondiente a los PMNs y los globulos rojos. Trasvasamos la fina capa superior de PMNs con globulos rojos residuales a otro tubo cónico de vidrio. Resuspendimos en 5 volúmenes de PBS pH 7.4 estéril, centrifugamos durante 15 min a 400 g, descartamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet en 10 mL de cloruro de amonio (0.85%), agitando lentamente por 10 minutos para lisar los eritrocitos. Luego, centrifugamos a 400g por 15 minutos, retiramos el sobrenadante y resuspendimos el pellet en 6 mL de PBS. Posteriormente centrifugamos a 400 g durante 10 minutos, descartamos el sobrenadante y resuspendimos en 4 mL de medio RPMI1640.

Luego de tener las células aisladas en el medio, efectuamos el conteo celular para observar cantidad y evaluar la viabilidad de los PMNs utilizando una cámara de Neubauer.

II.11.2. Conteo y evaluación de la viabilidad celular

Tomamos una alícuota de 10 μ L de la suspensión celular y le adicionamos 10 μ L de colorante azul de tripán para realizar el recuento de las células en una cámara hemocitométrica de Neubauer.

El azul tripán, es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas, para ensayos de viabilidad, permitiendo diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas o tejidos con membrana celular intacta no se colorean, debido a que dicha membrana es selectivamente permeable respecto a los compuestos que pueden atravesarla, de ahí que las células viables, es decir, con

membrana intacta, no permiten la incorporación del colorante azul de tripán. Por el contrario, sí este colorante atraviesa la membrana de las células, indica que la misma no está intacta y por tanto las células no son viables, apareciendo de un distintivo color azul bajo el microscopio. Debido a que las células vivas excluyen al colorante y no se tiñen, este método también se llama método de tinción por exclusión.

La lectura de las células viables y no viables fue realizada en microscopio óptico (Leica DM500) y el cálculo del número de células/mL fue determinado a partir de la siguiente ecuación: $V \times FN \times FT/\#Q$, (donde V corresponde al número de células viables contadas; FN es el factor de la cámara de Neubauer; FT es el factor de dilución del azul de tripán y #Q, el número de cuadrantes de la cámara utilizados para el recuento).

La viabilidad se determinó por la técnica de exclusión vital, o sea, exclusión de las células no teñidas por el azul de tripán, como anteriormente se describió. La viabilidad celular se expresó como porcentaje aplicando la ecuación: $V \times 100/NT$, donde NT es el número total de células (viables y no viables) contadas en la cámara. Con este método obtuvimos un 95% de células vivas en todos los aislamientos.

Además de la viabilidad, se realizó la identificación de los PMNs mediante tinción de May Grundwald-Giemsa. La tinción de May Grundwald (se compone por azul de metileno/eosina) permite teñir el citoplasma y las granulaciones, y la tinción Giemsa (compuesto por eosina de metileno/eosina y azul) permite teñir el núcleo.

II.11.3. Exposición de los PMNs al AE de *M. armillaris*

Las células aisladas fueron cultivadas en estufa a 37 °C en condiciones de microaerofilia corroborando la viabilidad cada 2 horas durante 8 horas. Para ello se colocaron 2 mL de suspensión celular (en RPMI 1640) en pocillos de placas multiwell de 6 pocillos a una concentración de 5×10^5 PMNs/mL.

Posteriormente se expusieron las células al AE de *M. armillaris* en diferentes concentraciones. Para lograr la disolución de la esencia se adicionó 2.5 % v/v de DMSO (Dimetilsulfoxido) al medio de cultivo. Las concentraciones de AE evaluadas fueron: 0.75%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%, 0.025%, 0.0125%. Se evaluó la viabilidad de las células a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas mediante la técnica de exclusión vital como se describió. Para ello, a cada tiempo de muestreo se retiró una alícuota de 10 μ L para colocarla en la cámara de Neubauer junto con el azul tripán. Además de evaluar lo sucedido con las distintas concentraciones del AE, se agregó un control positivo conteniendo PMNs disueltos en RPMI 1640 y otro control con adición de DMSO 2.5 % v/v. Los recuentos de PMN/mL fueron graficados en función del tiempo para evaluar la pérdida de viabilidad producida.

III. RESULTADOS

III.1. Extracción del AE de *M. armillaris*

Una pequeña porción del material vegetal (100 g) se reservó para determinar el rendimiento siguiendo las recomendaciones de la FA VII Ed. con un equipo Clevenger (Figura 9). Se obtuvo un rendimiento del 1.55% v/p para el AE julio 2015.



Figura 9. Equipo Clevenger para determinar el rendimiento de extracción de *M. armillaris*.

La extracción de los 44.75 Kg de hojas y ramas herbáceas recolectados se llevó a cabo en un equipo especialmente diseñado (Figura 10A). Se utilizaron 38.5 litros de agua para la destilación y el proceso completo de destilado duró 5 horas, extrayéndose 550 mL de AE en julio 2015 y 515 mL en julio 2017 (Figura 10B). La esencia extraída fue separada del agua condensada mediante una ampolla de decantación (Figura 10C) y secada con cloruro de sodio anhidro. Luego del secado se filtró y se guardó en un frasco de vidrio color ambar en heladera a 4 °C. Se llevó a cabo el mismo procedimiento con material vegetal extraído de las mismas

plantas en Julio 2017 a fines de comparar la composición porcentual del AE en el mismo mes, pero año diferente. Este solo se caracterizó cromatográficamente.

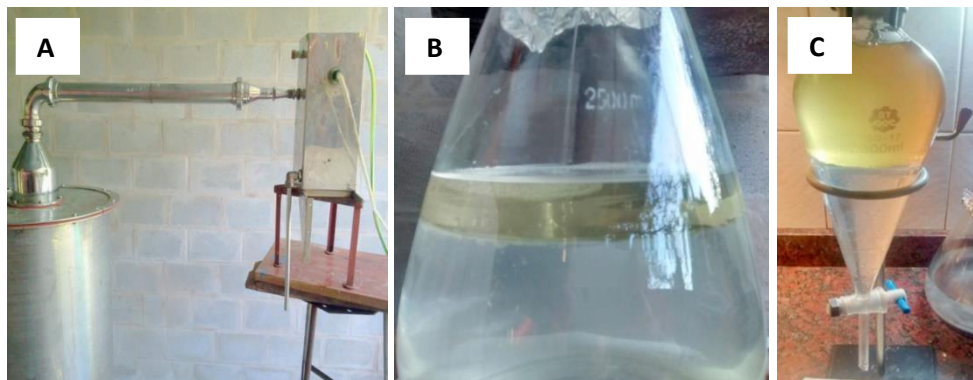


Figura 10. Equipo de destilación con producción de vapor *in situ* usado en la extracción del AE de *M. armillaris* (A). AE obtenido en el proceso (B) y su separación (C).

III.2. Caracterización del AE de *M. armillaris* obtenido

Una vez obtenido el AE en el mes de Julio 2015 se procedió a caracterizarlo fisicoquímicamente. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Aspecto a 20 °C:** Líquido oleoso y límpido
- Olor:** Penetrante, muy fresco
- Sabor:** Amargo, astringente
- Color:** Amarillo pálido
- Densidad (mediante uso de picnómetro):** 0.89197-0.93013 g/mL
- Solubilidad en aceite mineral (1:1):** Soluble
- Solubilidad en agua (1:10):** Parcialmente soluble
- Solubilidad en etanol 70% (1:1):** Soluble
- Índice de refracción a 20 °C:** 1.4698 -1.4703
- Índice de acidez:** 0.7824
- Índice de esterificación:** 32.8526

La composición de los aceites obtenidos en los años 2015 y 2017 se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa y con detector de

ionización de llama (GC-FID-MS). En la Tabla 3 se muestra la composición porcentual del AE resultante del análisis del cromatograma obtenido en Julio 2015 (Figura 11) y Julio 2017. La suma total de los componentes encontrados da un 99.5%. Los resultados indican que el 1.8 cineol es el componente principal (71.9-72.3%), seguido de limoneno (7.8-8.2%) y α -pineno (6%) para las dos temporadas evaluadas.

Tabla 3. Composición porcentual del AE de *M. armillaris* obtenido en Julio 2015 y en Julio 2017.

COMPONENTE	NO POLAR	POLAR	COMPOSICIÓN PORCENTUAL AE Julio 2015	COMPOSICIÓN PORCENTUAL AE Julio 2017
α -Tujeno	926	1036	1.5	1.7
α -Pineno	935	1043	6.0	6.0
Sabineno	968	1138	1.0	0.4
Myrceno	974	1170	2.2	2.6
β -Pineno	979	1133	2.2	2.9
α -Phellandreno	1005	1191	0.1	0.1
α -Terpineno	1012	1206	0.2	0.3
P-Cimeno	1018	1286	1.4	0.6
1.8-Cineol	1022	1234	72.3	71.9
Limoneno	1024	1221	7.8	8.6
Trans- β -Ocimeno	1032	1260	0.2	0.6
γ -Terpineno	1047	1264	0.5	0.7
Terpinoleno	1082	1305	0.1	0.1
δ -Terpineol	1150	1674	0.1	0.1
Terpinen-4-ol	1164	1614	1.4	0.9
α -Terpineol	1172	1705	1.4	0.9
Geranyl acetato	1359	1760	0.2	0.1
β -Caryophylleno	1417	1614	0.5	0.4
Aromandendreno	1437	1622	0.1	0.1
Geranyl isobutyrate	1496	1794	0.1	0.1
Cis-Calameneno	1508	1841	0.1	0.1
Oxi-Caryophylleno	1565	1989	0.1	trazas
		Total	99.5	99.3

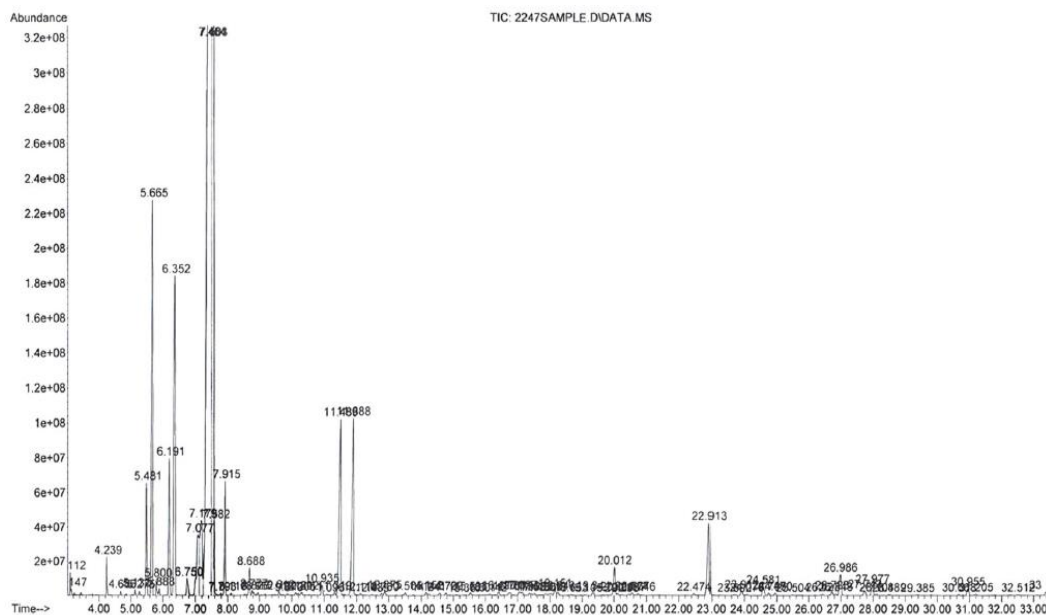


Figura 11. Cromatograma obtenido por cromatografía gaseosa con el detector de espectrometría de masas del AE de *M. armillaris* julio 2015.

III.3. Selección de cepas y aislamientos

El total de los 120 aislamientos salvajes de campo y cepas de referencia de *S. aureus* existentes en el Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT) fueron nuevamente incubados a 35 °C en AMH con 5% de sangre bovina por un período de 24 h. También se incluyó una cepa SARM provista por el INEIANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" (caracterizada en Egea y col., 2014). Todas dieron lugar a la formación de colonias circulares de entre 1 y 3 mm de diámetro, de apariencia lisa, cremosa con un perfil convexo, bordes netos y coloración blanca amarillenta (Figura 12). Posteriormente, se repicaron en agar nutritivo para mantenerlas en heladera y luego llevar a cabo las pruebas de sensibilidad por antibiograma (Figura 13).

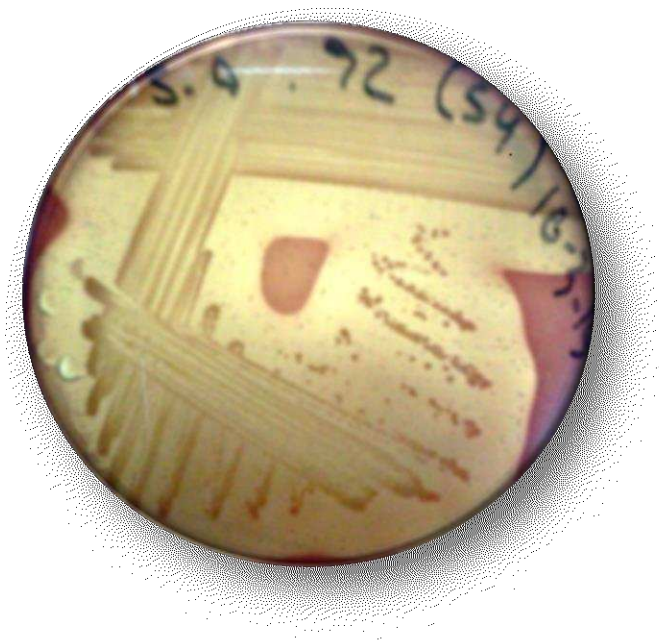


Figura 12. Aislamientos β -hemolíticos obtenidos.



Figura 13. Resultados de prueba de antibiograma por difusión en placa.

Los antimicrobianos probados para determinar la presencia de resistencia son los mencionados en el punto II.4.4. Se obtuvieron 8 aislamientos resistentes a penicilina, 1 a oxacilina, 4 a clindamicina, 4 a azitromicina, 1 a cefoxitina, 3 a

tetraciclina y 3 a eritromicina. Para el resto de los antibióticos (cefoperazona, cefalexina, enrofloxacin, vancomicina, ciprofloxacina, gentamicina y rifampicina) todas las cepas se presentaron como sensibles.

Luego de obtener los perfiles de sensibilidad de las cepas estudiadas se seleccionaron las cepas en base a los antibióticos con los que se deseaba trabajar:

- con sensibilidad a oxacilina y ceftioxa (como marcadores de cloxacilina), eritromicina y rifampicina (como marcador de rifaximina): 3 aislamientos salvajes (SA 13, SA 96 y SA 139).
- con resistencia a oxacilina y ceftioxa (como marcadores de cloxacilina): 1 cepa (SARM 5-I).
- con resistencia a eritromicina: 3 aislamientos (SA 78A, SA 79A y SA 86B).

III.4. Determinación de la CIM y CBM *in vitro* de cloxacilina, rifaximina, eritromicina y del AE frente a *S. aureus* a pH 7.4, 6.5 y 5.

Según mencionamos en el apartado Materiales y Métodos, se determinó la CIM a través de la prueba de microdilución en caldo empleando placas de microtitulación de 96 pocillos (Figura 14). Se evaluó la incidencia del pH en la sensibilidad de los microorganismos a los antibacterianos, determinando la CIM a pH 7.4, 6.5 y pH 5.0.

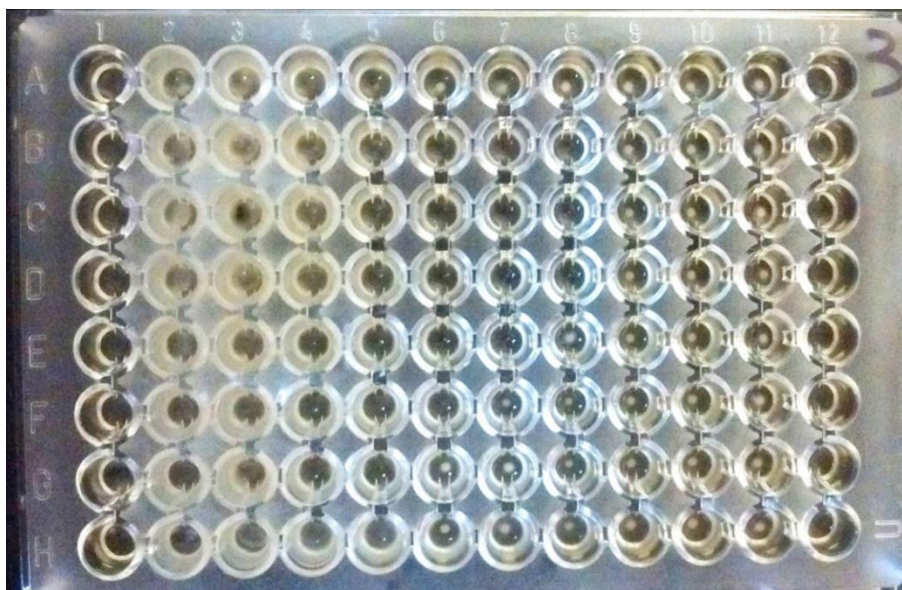


Figura 14. Placa de microtitulación para determinación de CIM.

III.4.1. CIM y CBM del AE de *M. armillaris*

Los resultados obtenidos en la determinación de la CIM en microplaca se expresaron en $\mu\text{L}/\text{mL}$ y se presentan en la tabla 5. Se puede observar un leve a moderado efecto de la acidez del medio en la potenciación de la esencia frente a las cepas SARM, de referencia y los aislamientos salvajes de *S. aureus*. A pH 5.0 la CIM fue menor que a pH 7.4 y 6.5 en forma muy significativa ($p < 0.001$). La cepa SARM y los aislamientos salvajes presentaron una CIM de $12.5 \mu\text{L}/\text{mL}$, mientras que para la cepa de referencia ATCC 29213 fue el doble a pH 7.4.

Tabla 4. Resultado de CIM del AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CIM AE <i>Melaleuca armillaris</i>			
<i>S. aureus</i>	CIM pH 7.4 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	CIM pH 6.5 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	CIM pH 5.0 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
ATCC 29213	25^a	25^a	12.5^b
SA 13	12.5^a	12.5^a	6.25^b
SA 96	12.5^a	12.5^a	6.25^b
SA 139	12.5^a	12.5^a	6.25^b
SARM 5-I	12.5^a	12.5^a	6.25^b
SA 78A	12.5^a	6.25^a	3.1^b
SA 79A	12.5^a	6.25^a	3.1^b
SA 86B	12.5^a	6.25^a	3.1^b

Diferentes letras en las CIMs de cada cepa entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.0001$).

La CBM para este aceite fue determinada a partir de los pocillos en los que no se desarrolló crecimiento y fue levemente superior a la CIM obtenida para las cepas SARM y de referencia, y aislamientos salvajes tratados (Tabla 5). Nuevamente, la acidificación del medio redujo significativamente la CBM a pH 5.0 respecto de los pHs 7.4 y 6.5 ($p < 0.01$).

Tabla 5. Resultado de CBM del AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CBM AE <i>Melaleuca armillaris</i>			
<i>S. aureus</i>	CBM pH 7.4 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	CBM pH 6.5 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	CBM pH 5.0 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
ATCC 29213	50^a	50^a	25^b
SA 13	25^a	25^a	25^b
SA 96	50^a	25^a	12.5^b
SA 139	25^a	25^a	12.5^b
SARM 5-I	25^a	25^a	12.5^b
SA 78A	12.5^a	6.25^a	3.1^b
SA 79A	12.5^a	6.25^a	3.1^b
SA 86B	12.5^a	6.25^a	3.1^b

Diferentes letras en las CBMs de cada cepa entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.01$).

III.4.2. CIM y CBM de cloxacilina

Los resultados de CIM para cloxacilina se presentan en la Tabla 6. El control de calidad fue realizado con la cepa de referencia ATCC 29213 y se utilizó como rango aceptable el indicado por la CLSI en su documento VET01-S2 (2013), el cual establece como aceptable el rango 0.12-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la oxacilina (única penicilina antiestafilocócica que figura en dicho documento). Se puede ver claramente como la acidificación del medio disminuye, en forma muy significativa, la concentración de antibiótico necesaria para inhibir ($p < 0.001$) y matar ($p < 0.0001$) al inóculo bacteriano. Esto es particularmente importante para la cepa meticilino resistente (SARM 5-I), para la cual la CIM desciende 128 veces a pH 5.0 respecto de la obtenida a pH 7.4. En la Tabla 7 se exponen los resultados de CBM obtenidos para cloxacilina ensayada a los 3 pHs.

Tabla 6. Resultado de CIM de cloxacilina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CIM CLOXACILINA			
<i>S. aureus</i>	CIM pH 7.4 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM pH 6.5 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM pH 5.0 ($\mu\text{g/mL}$)
ATCC 29213	0.125^a	0.062^b	0.031^c
SA 13	0.5^a	0.125^b	0.031^c
SA 96	0.5^a	0.125^b	0.031^c
SA 139	0.5^a	0.125^b	0.031^c
SARM 5-I	512	512	4

Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.001$). Los valores sin diferencias significativas tienen la letra similar (a, b o c). (En el análisis estadístico se excluyó a SARM 5-I).

Tabla 7. Resultado de CBM de cloxacilina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CBM CLOXACILINA			
<i>S. aureus</i>	CBM pH 7.4 ($\mu\text{g/mL}$)	CBM pH 6.5 ($\mu\text{g/mL}$)	CBM pH 5.0 ($\mu\text{g/mL}$)
ATCC 29213	0.5^a	0.25^b	0.062^c
SA 13	1^a	0.25^b	0.062^c
SA 96	1^a	0.5^b	0.062^c
SA 139	1^a	0.25^b	0.125^c
SARM 5-I	>512	>512	8

Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas con $p < 0.0001$. Los valores sin diferencias significativas tienen la letra similar (a, b o c). (En el análisis estadístico se excluyó a SARM 5-I).

III.4.3. CIM y CBM de rifaximina

En el caso de rifaximina, al igual que para cloxacilina, tampoco se cuenta con valor de CIM de control de calidad. La CLSI en su documento VET01-S2 (2013) establece el rango para la rifampicina, siendo de 0.004-0.016 $\mu\text{g/mL}$ (única ansamicina que figura en dicho documento). El valor obtenido fue de 0.032 $\mu\text{g/mL}$, el cual es ligeramente superior al establecido para la rifampicina. La Tabla 8

presenta los resultados de CIM de rifaximina frente a la cepa de referencia y los aislamientos salvajes. La acidificación del medio no influyó en la concentración inhibitoria, el valor de CIM se mantuvo en los tres valores de pH estudiados.

Tabla 8. Resultado de CIM de rifaximina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CIM RIFAXIMINA			
<i>S. aureus</i>	CIM pH 7.4 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM pH 6.5 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM pH 5.0 ($\mu\text{g/mL}$)
ATCC 29213	0.032	0.032	0.032
SA 13	0.032	0.032	0.032
SA 96	0.032	0.032	0.032
SA 139	0.032	0.032	0.032

En cuanto a la CBM de rifaximina se observó que los valores fueron superiores a la CIM obtenida para este antibiótico. Si bien el parámetro de inhibición no se modificó con la acidez, si lo hace la concentración bactericida, particularmente a pH 5.0, siendo menor, en forma extremadamente significativa, que a pH 7.4 y 6.5 ($p < 0.0001$).

Tabla 9. Resultado de CBM de rifaximina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CBM RIFAXIMINA			
<i>S. aureus</i>	CBM pH 7.4 ($\mu\text{g/mL}$)	CBM pH 6.5 ($\mu\text{g/mL}$)	CBM pH 5.0 ($\mu\text{g/mL}$)
ATCC 29213	0.512^a	0.512^a	0.064^b
SA 13	0.512^a	0.512^a	0.128^b
SA 96	0.512^a	0.512^a	0.128^b
SA 139	0.512^a	0.512^a	0.128^b

Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas con $p < 0.0001$. Los valores sin diferencias significativas tienen la letra similar (a o b).

III.4.4. CIM y CBM de eritromicina

En el caso de eritromicina se obtuvo para la cepa de referencia ATCC 29213 un valor concordante con el rango establecido por la CLSI (2013) en su documento VET01-S2 (0.25-1 µg/mL) a pH 7.4. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10. Se observa que los valores de CIM aumentan al acidificar el medio.

Tabla 10. Resultado de CIM de eritromicina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CIM ERITROMICINA			
<i>S. aureus</i>	CIM pH 7.4 (µg/mL)	CIM pH 6.5 (µg/mL)	CIM pH 5.0 (µg/mL)
ATCC 29213	0.5	1	8
SA 13	0.5	1	8
SA 96	0.5	1	8
SA 139	0.5	1	8
SA 78A	1024	>1024	>1024
SA 79A	1024	>1024	>1024
SA 86B	1024	>1024	>1024

El efecto de la acidez sobre la actividad de eritromicina frente a *S. aureus* también se observa en la CBM (Tabla 11). Las concentraciones bactericidas encontradas fueron muy elevadas, tanto para la cepa de referencia ATCC 29213 y los aislamientos salvajes sensibles (SA 13, SA 96 y SA 139) como para los aislamientos salvajes resistentes (SA 78A, SA 79A y SA 86B).

Tabla 11. Resultado de CBM de eritromicina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CBM ERITROMICINA			
<i>S. aureus</i>	CBM pH 7.4 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CBM pH 6.5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CBM pH 5.0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
ATCC 29213	32	256	>256
SA 13	32	256	>256
SA 96	32	256	>256
SA 139	32	256	>256
SA 78A	>1024	>1024	>1024
SA 79A	>1024	>1024	>1024
SA 86B	>1024	>1024	>1024

III.5. Determinación de la CIM *in vitro* de la combinación de los diferentes antimicrobianos con el AE frente a *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.

III.5.1. Combinaciones AE y cloxacilina

Luego de combinar el AE y cloxacilina a los valores de pH mencionados se puede observar la disminución de la concentración de antibiótico necesaria para lograr la inhibición bacteriana, tal como se muestra en la Tabla 12. La presencia del extracto vegetal en contacto con cloxacilina genera un efecto principalmente de sinergismo parcial a pH 7.4 para las cepas SARM, de referencia y los aislamientos analizados; sinergismo a pH 6.5 para la cepa de referencia con indiferencia para las cepas salvajes y, por último, sinergismo para la cepa de referencia y sinergismo parcial para las salvajes a pH 5.0. Aquí se puede observar como la acidez del medio mejora la actividad del antibiótico, y esta, a su vez, incrementa su actividad aún más en presencia del AE, manteniendo la interacción sinérgica al descender el pH.

En base a los resultados obtenidos en las pruebas de sinergismo mediante tablero de damas se seleccionaron las combinaciones que presentaron valores de CFI menores para luego evaluarlos en los ensayos de curva de muerte bacteriana (Tabla 13).

III.5.2. Combinaciones AE y rifaximina

Al combinar AE de *M. armillaris* con rifaximina a pH 7.4, 6.5 y 5.0 se puede observar la disminución de la concentración necesaria de antibiótico para lograr la inhibición bacteriana, tal como se expone en la Tabla 14. A pH 7.4 se obtuvieron combinaciones con sinergismo parcial. Con la acidificación del medio se lograron obtener combinaciones que presentaron sinergismo, siendo más evidente a pH 5.0. Fueron seleccionadas aquellas combinaciones con menores valores de CFI para la cepa de referencia y cada aislamiento salvaje, y cada pH (Tabla 15) para luego trabajar en la construcción de curvas de muerte bacteriana.

III.5.3. Combinaciones AE y eritromicina

En el caso de las combinaciones del AE con eritromicina la situación fue diferente a la de los antibióticos anteriores. La CIM de este macrólido aumenta al acidificar el medio (Tabla 16). En cuanto a las combinaciones, se lograron obtener mezclas que presentan sinergismo parcial a los 3 valores de pH, pero en éstas la cantidad de AE no logró compensar la pérdida de actividad del antibiótico por la acidez del medio. De este modo, en las combinaciones obtenidas también se produjo un incremento en la concentración de la eritromicina a pHs más bajos. Al igual que en los casos anteriores, se seleccionaron las mezclas con valores de CFI menores (Tabla 17).

Tabla 12. Resultado de prueba de sinergismo de combinaciones AE/cloxacilina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	AE ($\mu\text{L/mL}$)	CLOX ($\mu\text{g/mL}$)	AE/CLOX ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI	AE ($\mu\text{L/mL}$)	CLOX ($\mu\text{g/mL}$)	AE/CLOX ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI	AE ($\mu\text{L/mL}$)	CLOX ($\mu\text{g/mL}$)	AE/CLOX ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI
ATCC 29213	25	0.125	12.5/0.031	0.75	25	0.062	6.25/0.031	0.75	12.5	0.031	3.1/0.007	0.47
			25/0.062	1.50			6.25/0.015	0.49			3.1/0.0035	0.36
			25/0.031	1.25			6.25/0.007	0.36			6.25/0.0016	0.55
SA 13	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.062	1.50	6.25	0.031	3.1/0.015	0.98
			3.12/0.25	0.75			12.5/0.031	1.25			3.1/0.007	0.73
			6.25/0.25	1.00			12.5/0.016	1.12			3.1/0.0035	0.61
SA 139	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.062	1.50	6.25	0.031	3.1/0.015	0.98
			6.25/0.062	0.62			12.5/0.031	1.25			3.1/0.007	0.73
			12.5/0.031	1.06			12.5/0.016	1.12			3.1/0.0035	0.61
SA 96	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.062	1.50	6.25	0.031	3.1/0.015	0.98
			3.12/0.25	0.75			12.5/0.031	1.25			3.1/0.007	0.73
			6.25/0.25	1.00			12.5/0.016	1.12			3.1/0.0035	0.61
SARM 5-I	12.5	512	6.25/64	0.62	12.5	512	6.25/64	0.62	6.25	4	3.1/1	0.75
			6.25/32	0.56			6.25/32	0.56			3.1/0.5	0.63
			6.25/16	0.53			6.25/16	0.53			1.6/1	0.53

Tabla 13. Combinaciones AE / cloxacilina elegidas para ensayo de curva de muerte bacteriana.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	CIM AE μL/mL	CIM CLOX μg/mL	CIM AE/CLOX (μL/mL)/(μg/mL)	CFI	CIM AE μL/mL	CIM CLOX μg/mL	CIM AE/CLOX (μL/mL)/(μg/mL)	CFI	CIM AE μL/mL	CIM CLOX μg/mL	CIM AE/CLOX (μL/mL)/(μg/mL)	CFI
ATCC 29213	25	0.125	12.5/0.031	0.75	25	0.062	6.25/0.007	0.36	12.5	0.031	3.1/0.0035	0.36
SA 13	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.016	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
SA 96	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.016	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
SA 139	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.016	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
SARM 5-I	12.5	512	6.25/16	0.53	12.5	512	6.25/16	0.53	6.25	4	1.6/1	0.53

Tabla 14. Resultados de la prueba de sinergismo de combinaciones AE/rifaximina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	AE ($\mu\text{L/mL}$)	RIF ($\mu\text{g/mL}$)	AE/RIF ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI	AE ($\mu\text{L/mL}$)	RIF ($\mu\text{g/mL}$)	AE/RIF ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI	AE ($\mu\text{L/mL}$)	RIF ($\mu\text{g/mL}$)	AE/RIF ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI
ATCC 29213	25	0.032	12.5/0.008	0.75	25	0.032	6.25/0.016	0.75	12.5	0.032	3.1/0.016	0.76
			12.5/0.004	0.63			6.25/0.008	0.51			3.1/0.008	0.51
			12.5/0.002	0.56			6.25/0.004	0.37			3.1/0.004	0.38
SA 13	12.5	0.032	6.25/0.008	0.75	12.5	0.032	3.1/0.016	0.76	6.25	0.032	1.6/0.016	0.76
			6.25/0.004	0.63			3.1/0.008	0.50			1.6/0.008	0.51
			6.25/0.002	0.56							1.6/0.004	0.38
SA 96	12.5	0.032	6.25/0.008	0.75	12.5	0.032	3.1/0.016	0.76	6.25	0.032	1.6/0.016	0.76
			6.25/0.004	0.63			3.1/0.008	0.50			1.6/0.008	0.51
			6.25/0.002	0.56							1.6/0.004	0.38
SA 139	12.5	0.032	6.25/0.008	0.75	12.5	0.032	3.1/0.016	0.76	6.25	0.032	1.6/0.016	0.76
			6.25/0.004	0.63			3.1/0.008	0.50			1.6/0.008	0.51
			6.25/0.002	0.56							1.6/0.004	0.38

Tabla 15. Combinaciones AE/rifaximina elegidas para ensayo de curva de muerte bacteriana.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	CIM AE $\mu\text{L/mL}$	CIM RIF $\mu\text{g/mL}$	CIM AE/RIF ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI	CIM AE $\mu\text{L/mL}$	CIM RIF $\mu\text{g/mL}$	CIM AE/RIF ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI	CIM AE $\mu\text{L/mL}$	CIM RIF $\mu\text{g/mL}$	CIM AE/RIF ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI
ATCC 29213	25	0.032	12.5/0.002	0.56	25	0.032	6.25/0.004	0.37	12.5	0.032	3.1/0.004	0.38
SA 13	12.5	0.032	6.25/0.002	0.56	12.5	0.032	3.1/0.008	0.50	6.25	0.032	1.6/0.004	0.38
SA 96	12.5	0.032	6.25/0.002	0.56	12.5	0.032	3.1/0.008	0.50	6.25	0.032	1.6/0.004	0.38
SA 139	12.5	0.032	6.25/0.002	0.56	12.5	0.032	3.1/0.008	0.50	6.25	0.032	1.6/0.004	0.38

Tabla 16. Resultados de las pruebas de sinergismo de combinaciones AE/eritromicina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	AE ($\mu\text{L/mL}$)	ERI ($\mu\text{g/mL}$)	AE/ERI ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI	AE ($\mu\text{L/mL}$)	ERI ($\mu\text{g/mL}$)	AE/ERI ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI	AE ($\mu\text{L/mL}$)	ERI ($\mu\text{g/mL}$)	AE/ERI ($\mu\text{L/mL}/\mu\text{g/mL}$)	CFI
ATCC 29213	25	0.5	12.5/0.5	1	25	1	3.1/0.25	0.37	12.5	8	6,25/4	1
			12.5/0.125	0.75			1.6/0.5	0.62			6.25/2	0.75
			6.25/0.25	0.75							6.25/1	0.62
											3.1/2	0.50
SA 13	12.5	0.5	6.25/0.25	1	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
			6.25/0.125	0.75			1.6/0.5	0.62			3.1/4	1
SA 96	12.5	0.5	6.25/0.25	1	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
			6.25/0.125	0.75			1.6/0.5	0.62			3.1/4	1
SA 139	12.5	0.5	6.25/0.25	1	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
			6.25/0.125	0.75			1.6/0.5	0.62			3.1/4	1
SA 78A	12.5	1024	6.25/256	0.75	6.25	>1024	3.1/512	<1	3.1	>1024	1.6/512	<1
			6.25/128	0.62			3.1/256	<0.75			1.6/256	<0.75
			6.25/64	0.56			3.1/128	<0.62			1.6/128	<0.62
SA 79A	12.5	1024	6.25/256	0.75	6.25	>1024	3.1/512	<1	3.1	>1024	1.6/512	<1
			6.25/128	0.62			3.1/256	<0.75			1.6/256	<0.75
			6.25/64	0.56			3.1/128	<0.62			1.6/128	<0.62
SA 86B	12.5	1024	6.25/256	0.75	6.25	>1024	3.1/512	<1	3.1	>1024	1.6/512	<1
			6.25/128	0.62			3.1/256	<0.75			1.6/256	<0.75
			6.25/64	0.56			3.1/128	<0.62			1.6/128	<0.62

Tabla 17. Combinaciones AE/eritromicina elegidas para el ensayo de curva de muerte bacteriana.

	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	CIM AE μL/mL	CIM ERI μg/mL	CIM AE/ERI (μL/mL)/(μg/mL)	CFI	CIM AE μL/mL	CIM ERI μg/mL	CIM AE/ERI (μL/mL)/(μg/mL)	CFI	CIM AE μL/mL	CIM ERI μg/mL	CIM AE/ERI (μL/mL)/(μg/mL)	CFI
<i>S. aureus</i>												
ATCC 29213	25	0.5	12.5/0.125	0.75	25	1	3.1/0.25	0.37	12.5	8	3.1/2	0.5
SA 13	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
SA 96	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
SA 139	12.5	0.5	6.25/125	0.75	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
SA 78 ^a	12.5	1024	6.25/64	0.56	6.25	>1024	3.1/128	<0.62	3.1	>1024	1.5/128	<0.62
SA 79 ^a	12.5	1024	6.25/64	0.56	6.25	>1024	3.1/128	<0.62	3.1	>1024	1.5/128	<0.62
SA 86B	12.5	1024	6.25/64	0.56	6.25	>1024	3.1/128	<0.62	3.1	>1024	1.5/128	<0.62

III.6. Ensayo de curva de muerte bacteriana

Luego de evaluar las concentraciones inhibitorias del AE, de los antibióticos seleccionados y de sus mezclas, realizamos la construcción de las curvas de muerte bacteriana. Este es un método cinético que permite evidenciar el poder bactericida de un antibacteriano. Se valoró la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de los antimicrobianos en estudio, en forma aislada y combinada con el AE. La curva de muerte bacteriana es un método complementario de la concentración bactericida mínima.

Se enfrentó un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en caldo. Las concentraciones utilizadas fueron 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM, más un control sin antimicrobianos. Se realizó recuento de colonias a los siguientes tiempos: 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h, los que fueron expresados en logaritmo de unidades formadoras de colonia (Log_{10} UFC/mL). El poder bactericida se establece con la caída de 3 logaritmos decimales en un tiempo determinado.

Cuando una población microbiana se expone a un agente letal, la cinética de la muerte es casi siempre exponencial ya que el número de sobrevivientes disminuye de forma geométrica con el tiempo. Si representamos gráficamente el logaritmo del número de sobrevivientes frente al tiempo, se obtiene una línea recta cuya pendiente negativa define la tasa de mortalidad. Esta tasa de mortalidad nos da una idea de la fracción de la población inicial que sobrevive durante un determinado periodo de tratamiento. Para determinar el número real de sobrevivientes es necesario conocer además el tamaño inicial de la población.

A continuación, se presentan los análisis de las curvas de muerte bacteriana realizadas con la cepa SARM y los aislamientos salvajes de *S. aureus* seleccionados; utilizadas en las pruebas de determinación de CIM y sinergismo en comparación con *S. aureus* ATCC 29213 (cepa de referencia), frente a cada uno de los tres antimicrobianos en estudio y sus combinaciones a pH 7.4, 6.5 y 5.0.

III.6.1. Aceite esencial

Las Figuras 15 a 22 presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y la cepa SARM de *S. aureus* seleccionados ($n=7$), como así también de la cepa de referencia ATCC 29213 frente a diferentes CIMs del AE a pH 7.4, 6.5 y 5.0 en CMH con 0.5% de Tween 80.

Las curvas de crecimiento bacteriano se modelaron con la ecuación de Gompertz (apartado II.10.3. de Materiales y Métodos). Los datos obtenidos se encuentran en las Tablas 18 (cepa de referencia) y 19 (cepas de tipo salvaje). A pH 6.5 y 5.0 hubo una disminución en el recuento bacteriano para 0.5 MIC, por lo que no fueron analizadas con este modelo.

Aquellas curvas donde el inóculo bacteriano disminuyó se analizaron con el modelo sigmoide menos base y los parámetros obtenidos se observan en las Tablas 20 (cepa de referencia) y 21 (cepas de tipo salvaje).

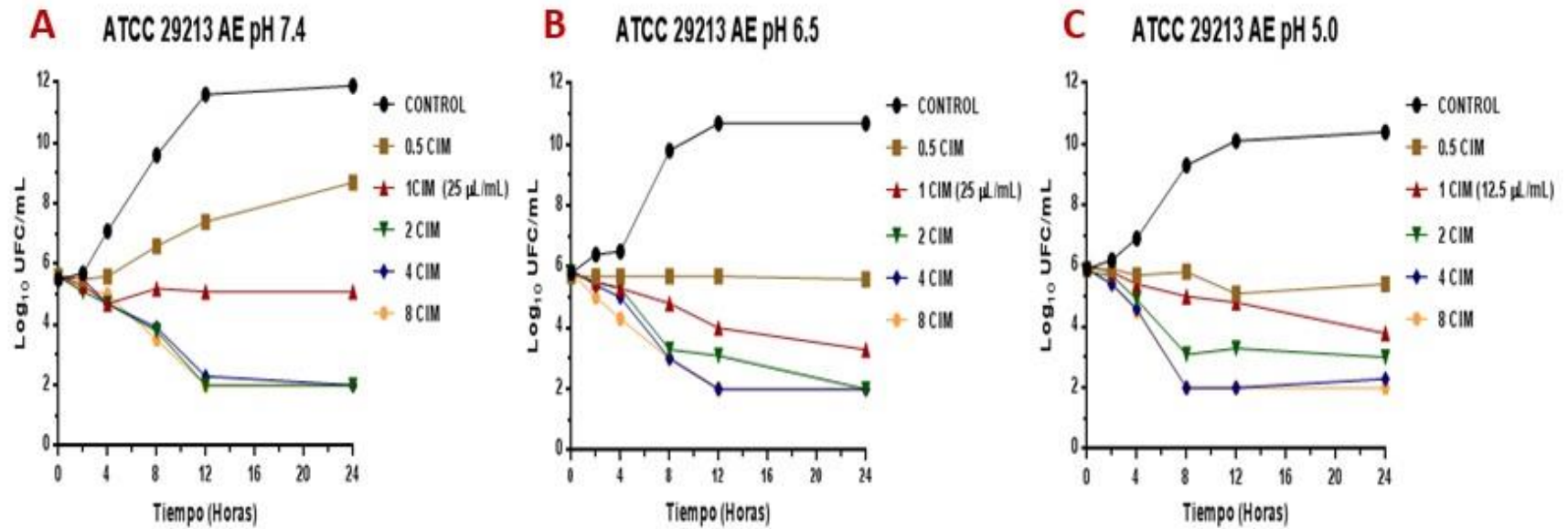


Figura 15. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a la cepa de referencia ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

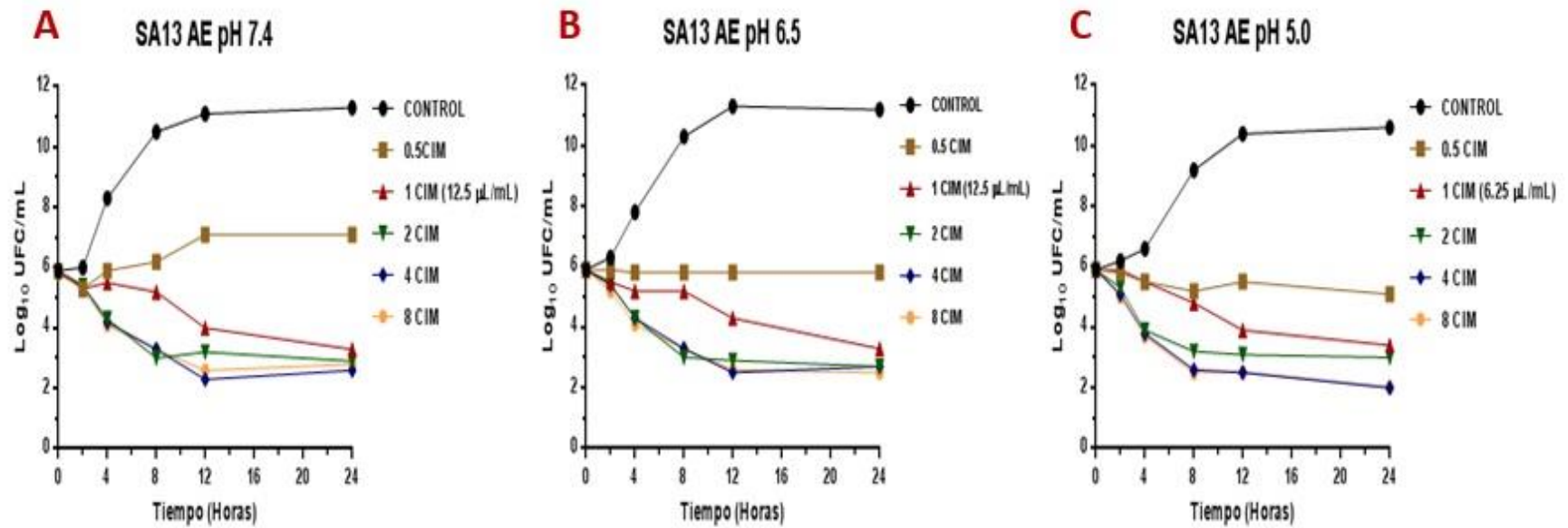


Figura 16. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

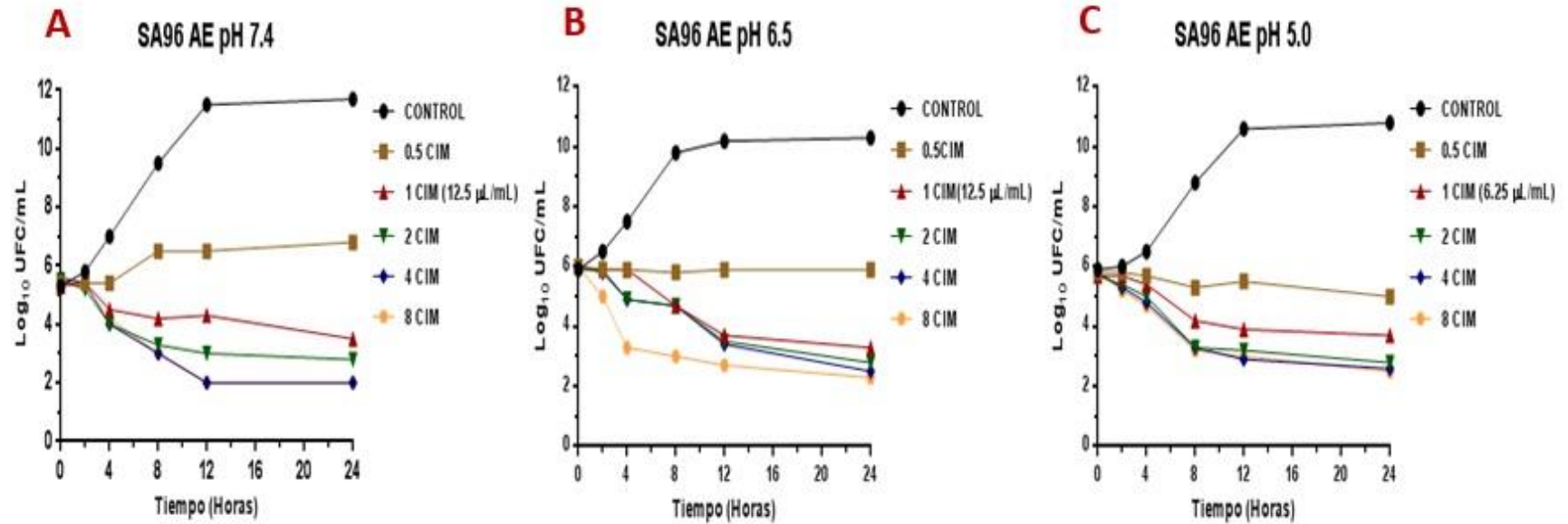


Figura 17. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

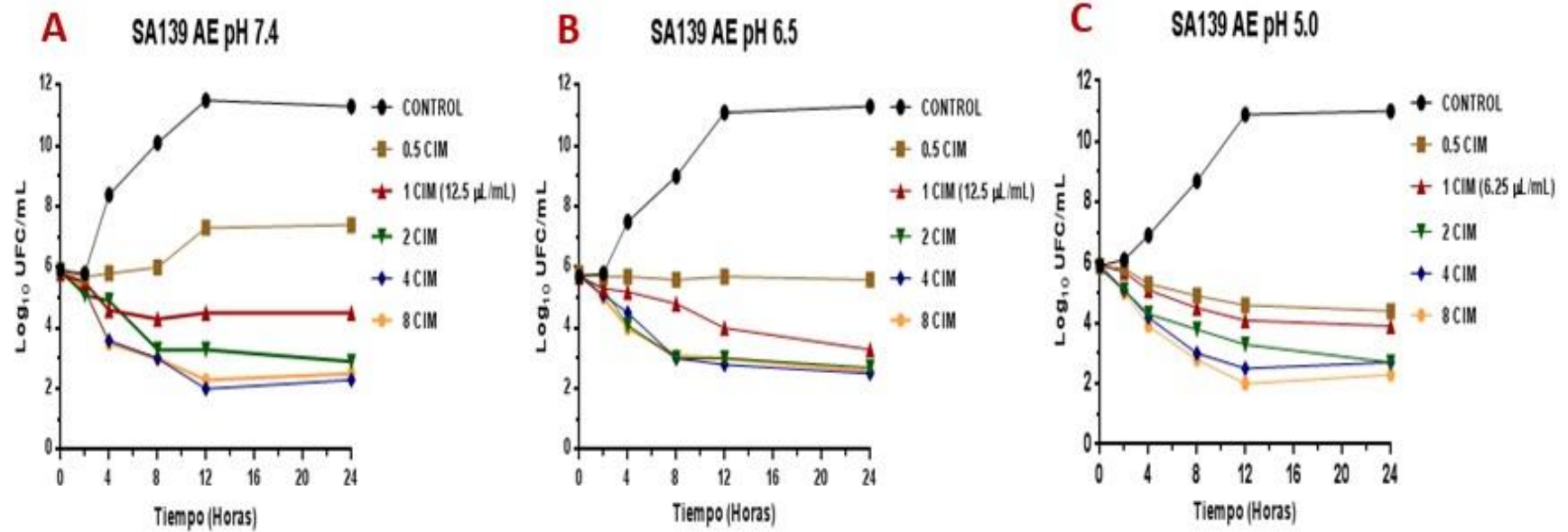


Figura 18. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

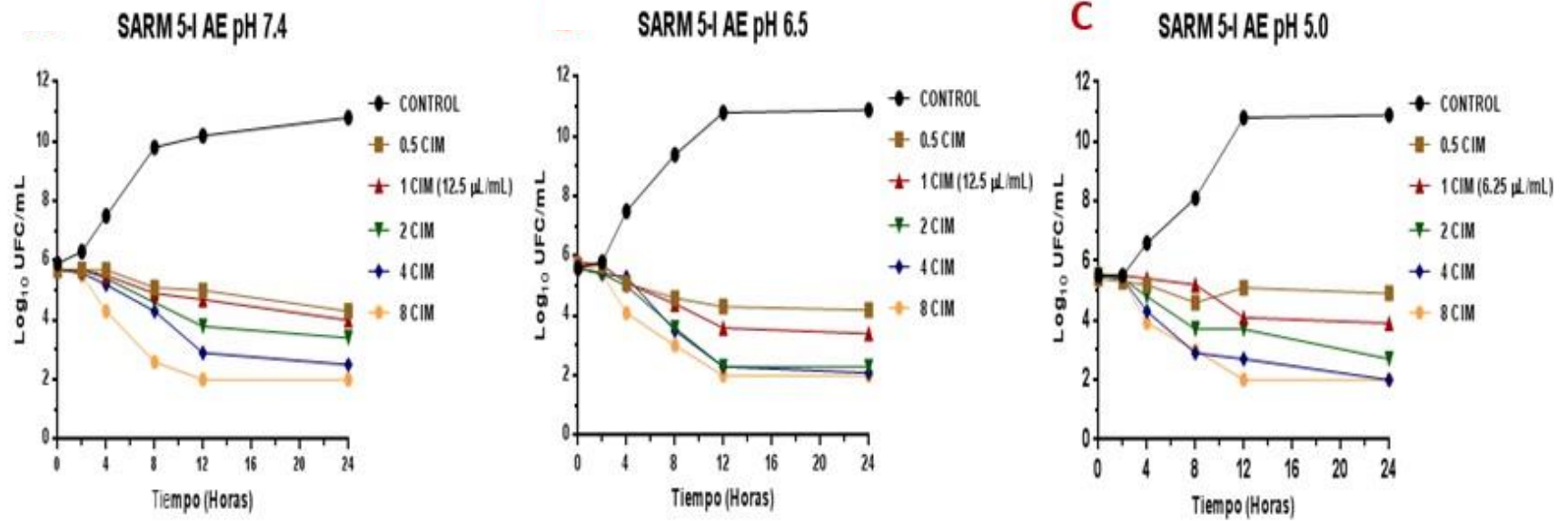


Figura 19. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

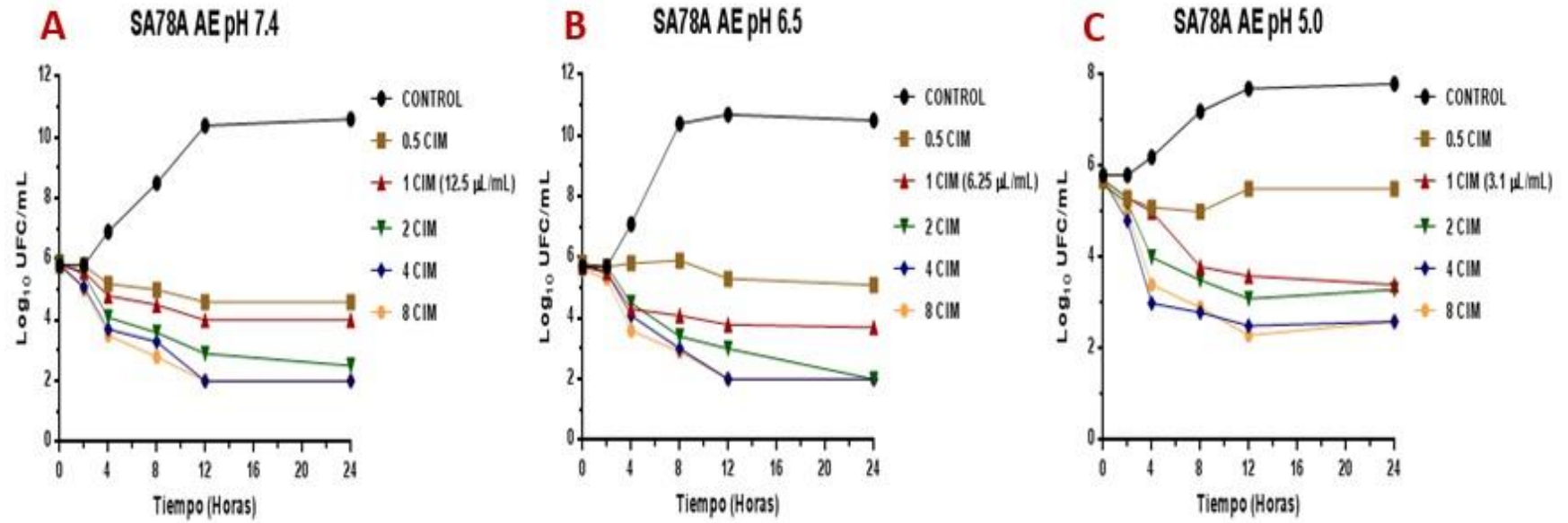


Figura 20. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SA78A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

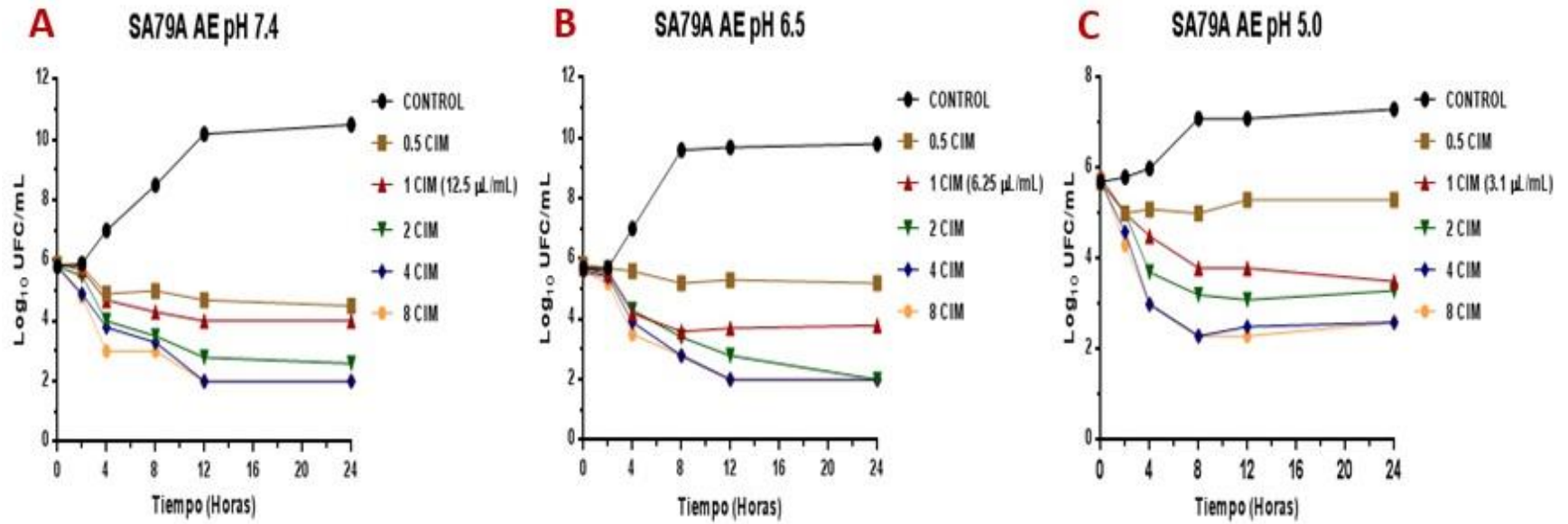


Figura 21. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SA79A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

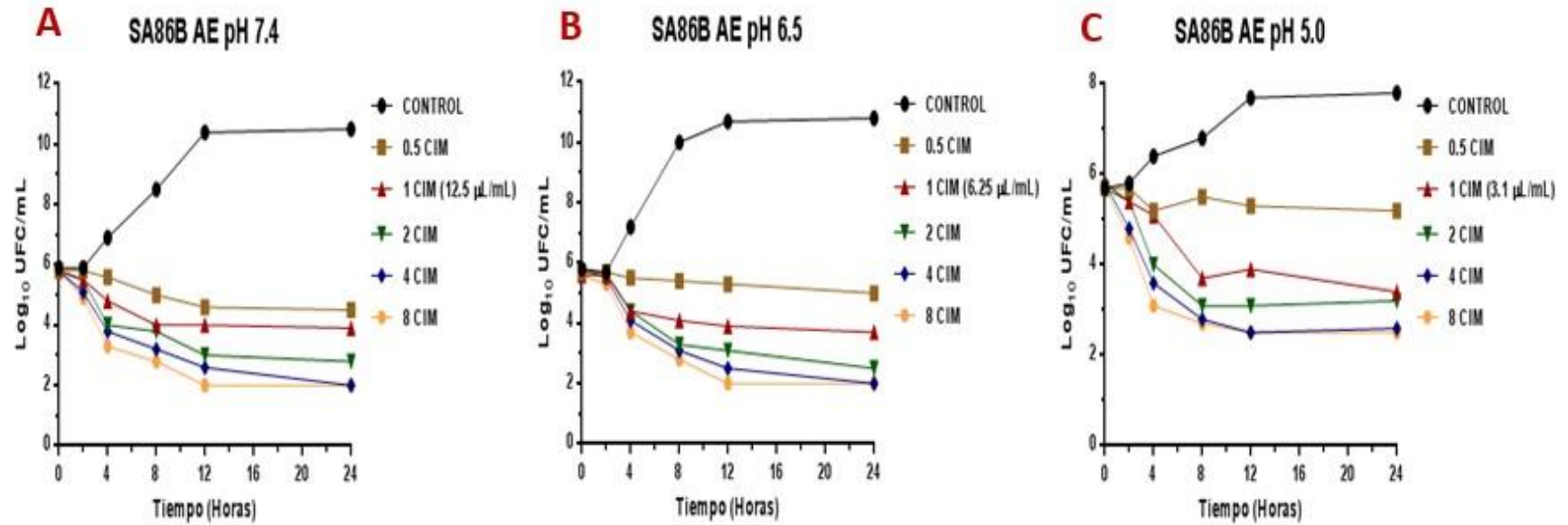


Figura 22. Curvas de muerte bacteriana para el AE de *M. armillaris* frente a SA86B a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Tabla 18. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 frente al AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Parámetro	pH 7.4		pH 6.5		pH 5.0	
	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM
R	0.994	0.952	0.998	-	1.000	-
μ (Log ₁₀ UFC/mL*h)	0.737	0.723	0.701	-	0.674	-
LPD (h)	1.793	9.961	2.475	-	2.542	-
MPD (Log ₁₀ UFC/mL)	12.204	8.658	10.839	-	10.399	-

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 19. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para las cepas salvajes frente al AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Parámetro	pH 7.4		pH 6.5		pH 5.0	
	Control	0.5 CIM*	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM
R	0.996	0.983	0.9971	-	0.994	-
μ (Log ₁₀ UFC/mL*h)	0.717	0.520	0.711	-	0.673	-
LPD (h)	1.809	6.811	1.883	-	3.462	-
MPD (Log ₁₀ UFC/mL)	11.853	6.855	10.909	-	9.504	-

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

*0.5 CIM: Las cepas SA78A y SARM 5-I fueron excluidas porque no pudieron analizarse por Gompertz.

Tabla 20. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para la cepa ATCC 29213 frente al AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Parámetro		0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	-	0.962	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	-	2.97E+05	3.75E+05	3.71E+05	4.20E+05
	γ	-	29.33	1.91	1.70	1.92
	T_{150} (h)	-	1.96	1.53	1.36	1.36
	N_0 (UFC/mL)	-	4.10E+05	3.70E+05	3.65E+05	4.15E+05
pH 6.5	R	0.974	0.999	0.995	0.999	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	1.62E+05	6.79E+05	7.16E+05	7.86E+05	5.91E+05
	γ	5.62	1.48	1.49	1.85	2.68
	T_{150} (h)	11.53	2.30	1.94	1.54	1.16
	N_0 (UFC/mL)	5.40E+05	6.49E+05	6.79E+05	7.70E+05	5.90E+04
pH 5.0	R	0.881	0.999	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	7.82E+05	8.97E+05	6.80E+05	7.82E+05	8.21E+05
	γ	1.30	2.48	4.60	3.31	3.35
	T_{150} (h)	6.40	2.82	2.54	1.68	1.59
	N_0 (UFC/mL)	8.77E+05	9.22E+05	6.80E+05	7.80E+05	8.20E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial

Tabla 21. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para las cepas salvajes frente al AE a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Parámetro		0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	-	0.986	0.997	0.999	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	-	6.90E+05	6.31E+05	6.31E+05	6.37E+05
	γ	-	15.150	7.360	4.090	4.490
	T_{150} (h)	-	7.150	2.610	2.390	1.911
	N_0	-	6.57E+05	6.79E+05	6.30E+05	6.31E+05
pH 6.5	R	0.980	0.998	1.000	0.999	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	3.44 E+05	6.35E+05	6.03E+05	6.11E+05	5.91E+05
	γ	20.921	8.740	5.582	4.621	5545.92
	T_{150} (h)	5.261	2.791	2.361	2.220	1.681
	N_0 (UFC/mL)	6.47 E+05	6.11E+05	6.05E+05	6.10E+05	5.91E+05
pH 5.0	R	0.980	0.998	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	4.49E+05	6.20E+05	5.31E+05	6.01E+05	5.94E+05
	γ	6.141	3.091	4.332	4.592	4.801
	T_{150} (h)	3.160	2.391	1.831	1.482	1.421
	N_0 (UFC/mL)	5.81E+05	6.17E+05	5.31E+05	6.00E+05	5.94E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial

III.6.2. Cloxacilina y combinaciones con AE

Las Figuras 23 a 27 presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes de *S. aureus* y las cepas SARM y de referencia frente a cloxacilina a pH 7.4, 6.5 y 5.0 en CMH. Los microorganismos utilizados fueron: 3 aislamientos sensibles (SA13, SA96 y SA139), una cepa resistente (SARM 5-I) y la cepa de referencia ATCC 29213.

Se aplicó el modelo de Gompertz a las curvas en las que se observó crecimiento según lo explicado en el apartado II.10.3. de Materiales y Métodos. Los datos obtenidos para el caso de cloxacilina se presentan en las Tablas 22 (cepa de referencia) y 23 (cepas de tipo salvaje). Este modelo se aplicó al control, 0.5 CIM y 1 CIM de cloxacilina. En el caso de 1 CIM el modelado de Gompertz no fue óptimo, arrojando valores de R muy bajos para la cepa de referencia a pH 6.5 y 5.0, y para las cepas salvajes a pH 7.4 y 6.5. Las concentraciones de 2, 4 y 8 CIM de cloxacilina produjeron una reducción del inóculo bacteriano, por lo cual se aplicó a las curvas el modelo sigmoideal. Los Parámetros obtenidos se observan en las Tablas 24 (cepa de referencia) y 25 (cepas de tipo salvaje).

En base a los resultados de las pruebas de sinergismo entre el AE y cloxacilina mencionados en el punto III.5.1 se construyeron las curvas de muerte bacteriana. Los valores de CIM tomados para las mezclas fueron aquellos que presentaron mayor sinergismo, es decir menores valores de CFI. Estos se presentan en la Tabla 13 de la sección III.5.1.

La proporción AE/cloxacilina obtenida como CIM se mantuvo para obtener las correspondientes 0.5 CIM, 2 CIM, 4 CIM y 8 CIM. Estas curvas también se construyeron a pH 7.4, 6.5 y 5.0 en CMH al 0.5% Tween 80 y se exponen en las Figuras 28 a 32.

A pH 7.4 y 6.5 la cepa de referencia (Tabla 26) y las cepas salvajes (Tabla 27) presentaron crecimiento en el control y a la concentración correspondiente a 0.5 CIM por lo cual se modelaron por Gompertz. En cambio, a pH 5.0 todas las cepas presentaron una disminución en el recuento bacteriano a esta concentración por

lo que se aplicó el modelo sigmoidal, al igual que para las concentraciones de 1, 2, 4 y 8 CIM para la cepa de referencia (Tabla 28) y las cepas salvajes (Tabla 29).

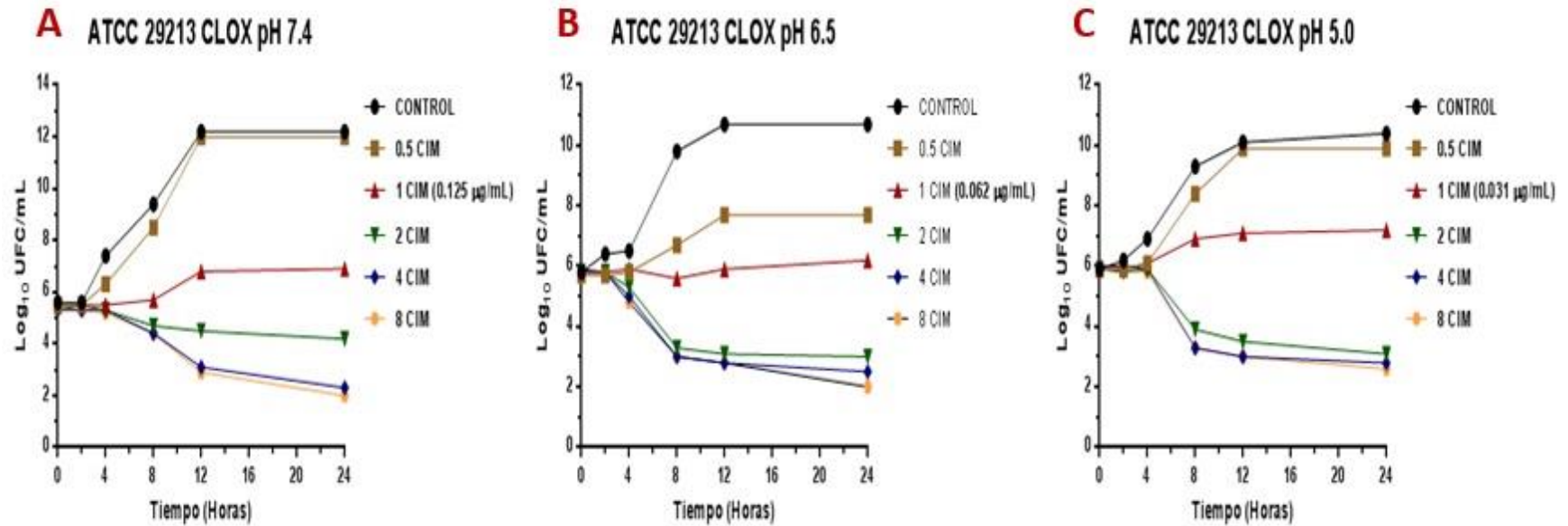


Figura 23. Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

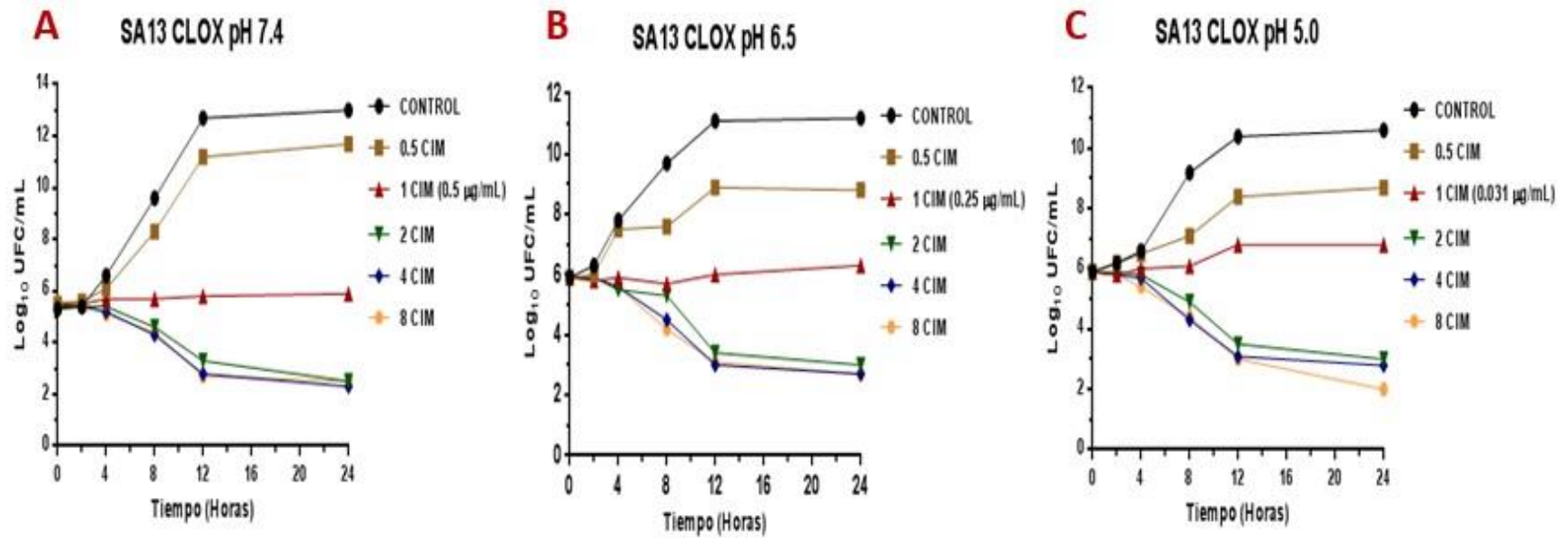


Figura 24. Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

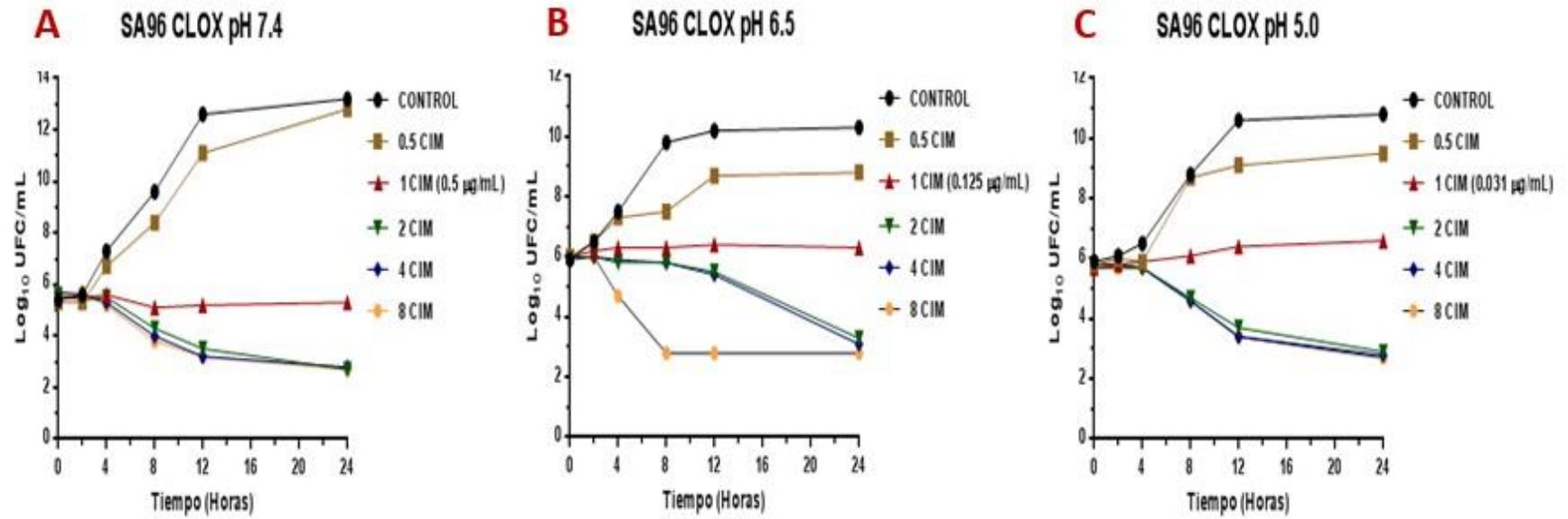


Figura 25. Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

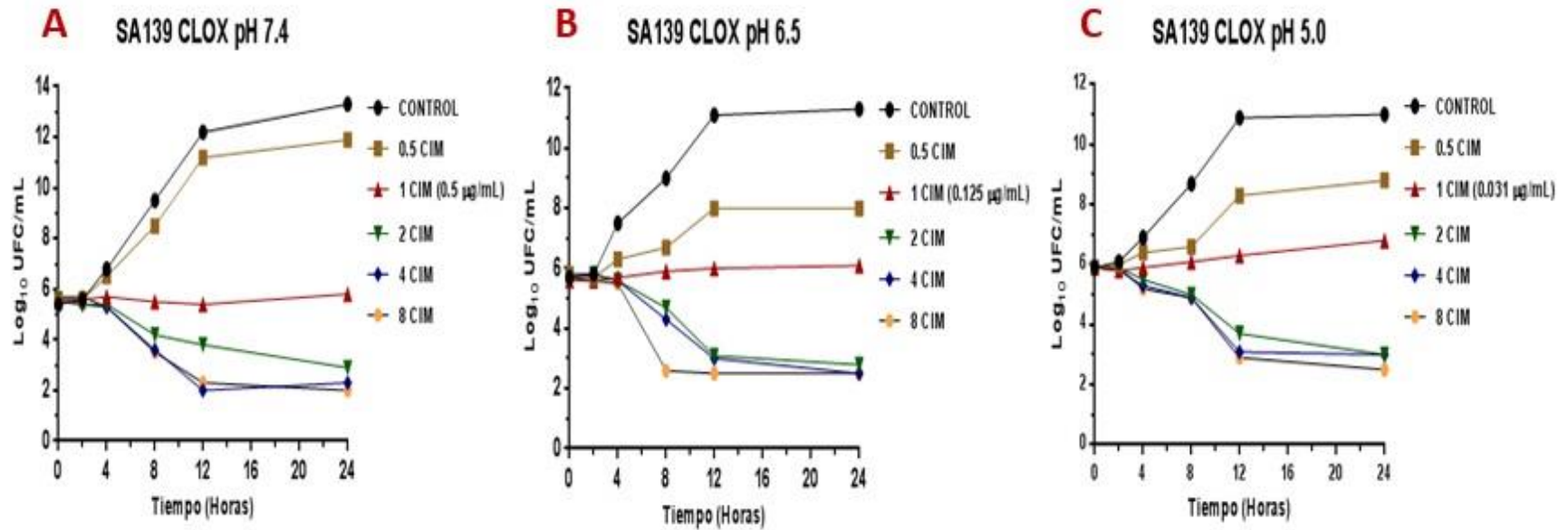


Figura 26. Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

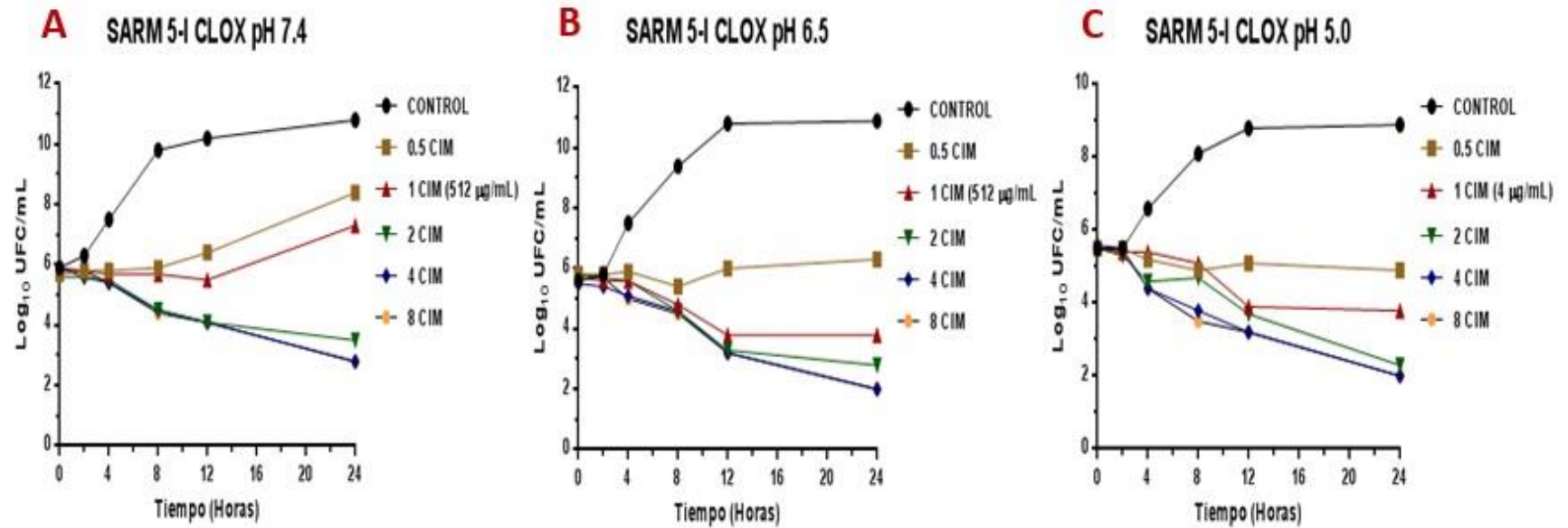


Figura 27. Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

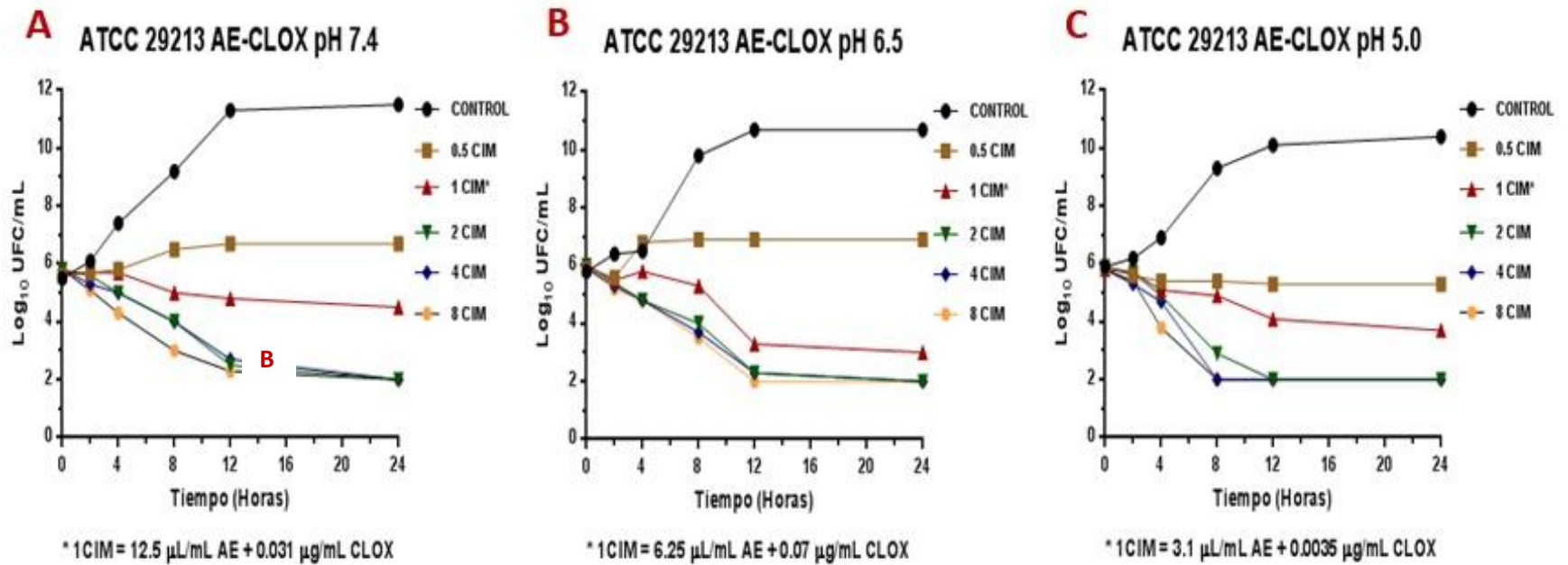


Figura 28. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y cloxacilina (AE-CLOX) frente a la cepa ATCC29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

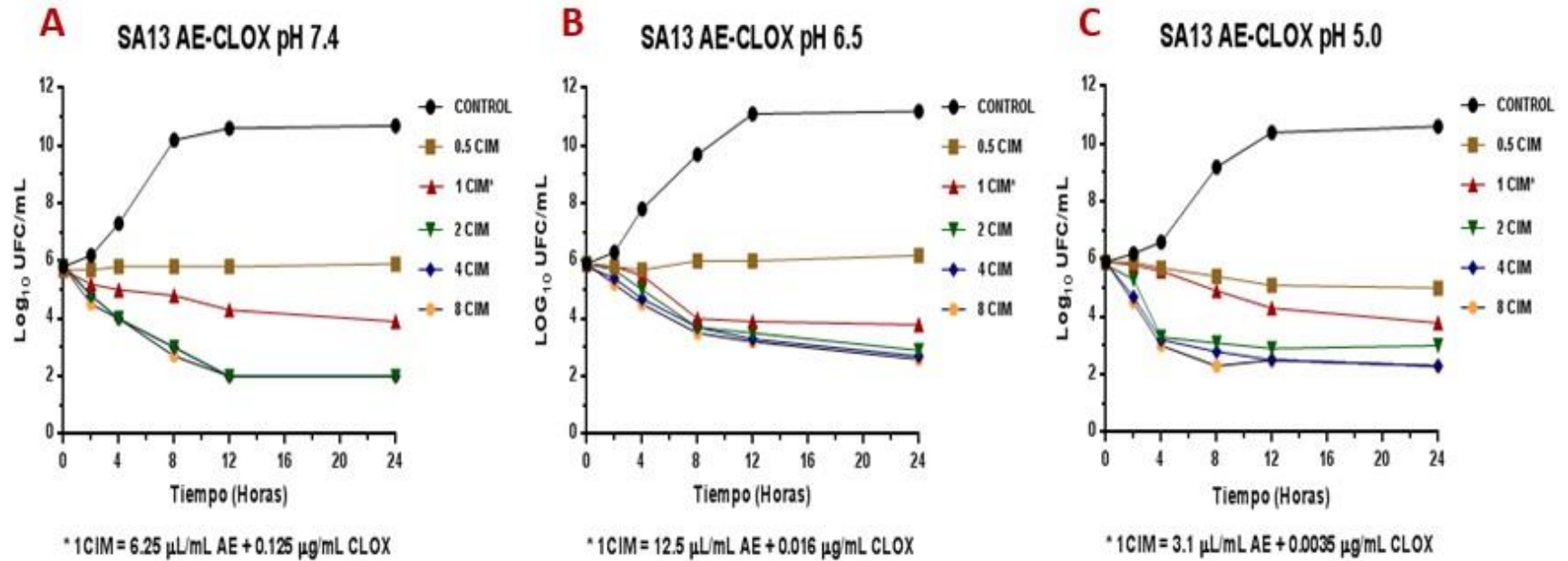


Figura 29. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

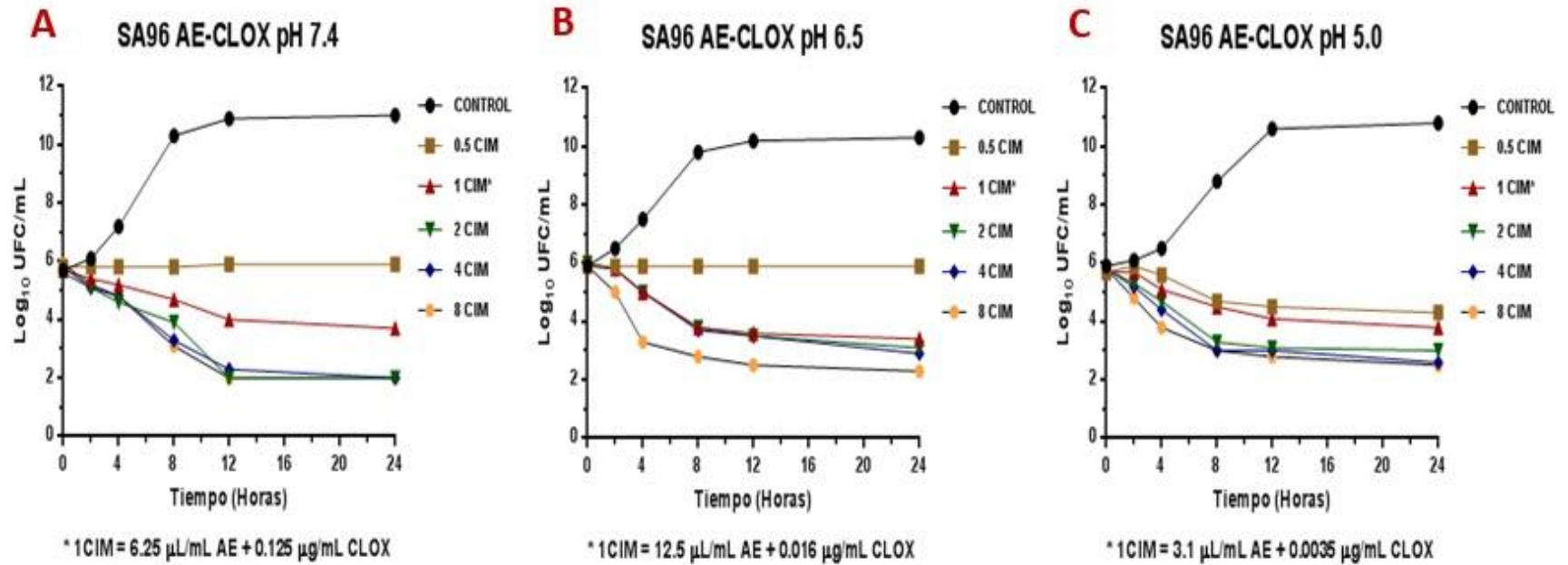


Figura 30. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

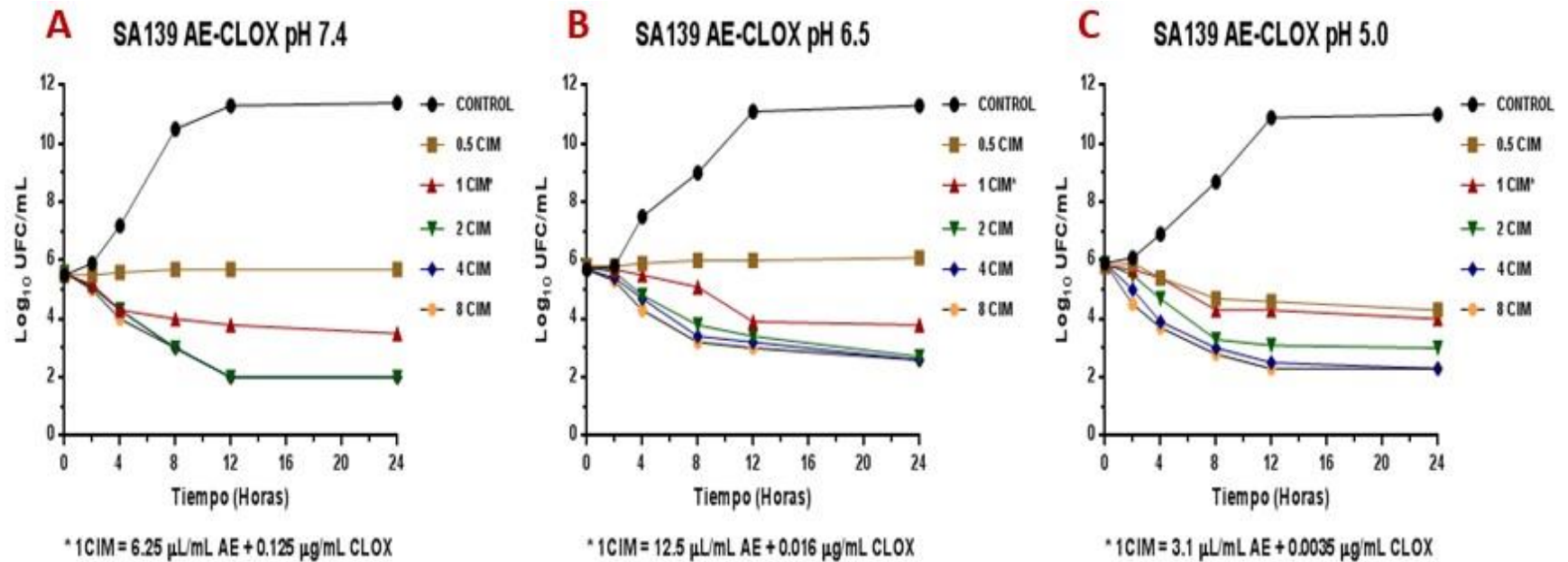


Figura 31. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

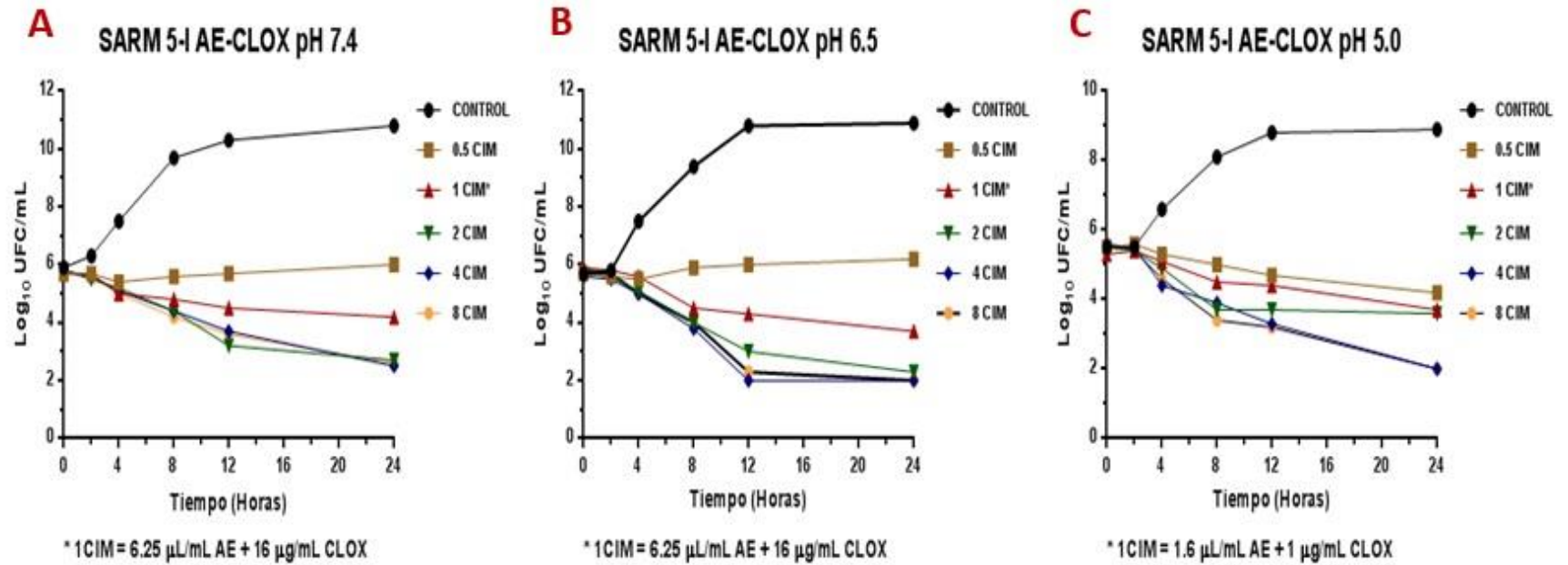


Figura 32. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Tabla 22. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina.

Parámetro	pH 7.4			pH 6.5			pH 5.0		
	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM
R	0.994	0.995	0.999	1.000	1.000	0.280	1.000	1.000	0.280
μ (UFC/mL*h)	0.8615	0.694	0.400	0.657	0.559	0.727	0.625	0.481	0.238
LPD (h)	2.279	4.680	7.460	2.868	6.252	4.625	2.353	3.752	3.208
MPD (UFC/mL)	12.204	11.796	6.875	10.755	7.716	5.907	10.3989	9.919	7.160

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 23. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina.

Parámetro	pH 7.4			pH 6.5			pH 5.0		
	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM
R	0.996	0.997	0.339	1.000	0.970	0.590	1.000	0.990	0.990
μ (UFC/mL*h)	0.751	0.744	-4.360	0.733	0.271	1.340	0.652	0.627	0.194
LPD (h)	1.452	4.825	0.414	1.645	1.966	-2.937	2.997	5.895	5.968
MPD (UFC/mL)	12.265	11.129	6.453	11.032	8.082	6.167	10.402	9.303	6.779

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 24. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina.

Parámetro		2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	0.950	0.999	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	2.18E+05	2.18E+05	2.18E+05
	γ	4.930	4.970	4.970
	T_{150} (h)	5.660	5.510	5.510
	N_0 (UFC/mL)	2.38E+05	2.16E+05	2.16E+05
pH 6.5	R	1.000	1.000	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	6.81E+05	7.70E+05	5.99E+05
	γ	4.870	5.690	33.800
	T_{150} (h)	3.250	2.920	2.666
	N_0 (UFC/mL)	6.79E+05	7.70E+05	6.00E+05
pH 5.0	R	1.000	1.000	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	6.81E+05	7.70E+05	5.99E+05
	γ	4.870	5.690	33.800
	T_{150} (h)	3.250	2.920	2.666
	N_0 (UFC/mL)	6.79E+05	7.70E+05	6.00E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidicidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial.

Tabla 25. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina.

Parámetro		2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	0.986	0.993	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	2.54E+05	4.83E+05	5.48E+05
	γ	10.510	2.330	4.150
	T_{150} (h)	5.610	3.500	3.330
	N_0 (UFC/mL)	3.49E+05	4.61E+05	5.47E+05
pH 6.5	R	0.984	0.995	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	6.97E+05	6.65E+05	7.38E+05
	γ	9.370	4.750	12.030
	T_{150} (h)	5.390	5.130	3.760
	N_0 (UFC/mL)	7.38E+05	6.76E+05	7.32E+05
pH 5.0	R	0.997	0.998	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	6.28E+05	6.32E+05	5.93E+05
	γ	4.440	5.730	11.860
	T_{150} (h)	4.080	3.870	3.820
	N_0 (UFC/mL)	6.31E+05	6.37E+05	6.01E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial.

Tabla 26. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina-AE.

Parámetro	pH 7.4		pH 6.5		pH 5.0	
	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM
R	0.990	0.999	1.000	0.991	1.000	-
μ (UFC/mL*h)	0.737	0.206	0.999	0.844	0.674	-
LPD (h)	1.793	3.396	3.758	4.485	2.542	-
MPD (UFC/mL)	12.204	6.681	10.755	6.888	10.399	-

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 27. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina-AE.

Parámetro	pH 7.4		pH 6.5		pH 5.0	
	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM
R	1.000	0.967	1.000	0.972	1.000	-
μ (UFC/mL*h)	0.749	0.367	0.733	0.036	0.653	-
LPD (h)	1.444	5.489	1.644	3.751	3.002	-
MPD (UFC/mL)	12.279	5.868	11.032	6.084	10.402	-

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 28. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina-AE.

Parámetro		0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	-	1.000	1.000	0.999	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	-	4.90E+05	6.84E+05	6.19E+05	5.81E+05
	γ	-	5.830	2.770	1.450	2.840
	T_{150} (h)	-	5.730	2.140	1.350	1.250
	N_0 (UFC/mL)	-	5.31E+05	6.80E+05	6.00E+05	5.80E+05
pH 6.5	R	-	0.890	1.000	0.999	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	-	4.85E+06	9.03E+05	8.10E+05	7.91E+05
	γ	-	0.380	2.390	1.720	1.590
	T_{150} (h)	-	801.520	1.350	1.050	0.940
	N_0 (UFC/mL)	-	9.46E+05	9.00E+05	8.00E+05	7.80E+05
pH 5.0	R	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	6.73E+05	6.25E+05	8.02E+05	7.05E+05	6.50E+05
	γ	2.020	3.700	3.590	2.280	5.950
	T_{150} (h)	3.870	2.590	2.150	1.350	1.870
	N_0 (UFC/mL)	6.41E+05	6.51E+05	8.00E+05	7.00E+05	6.50E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial.

Tabla 29. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina-AE.

Parámetro		0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	-	1.000	0.999	0.999	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	-	4.95E+05	5.40E+05	6.33E+05	6.33E+05
	γ	-	3.130	2.340	2.660	2.610
	T_{150} (h)	-	1.860	1.430	1.430	1.320
	N_0 (UFC/mL)	-	4.90E+05	5.30E+05	6.30E+05	6.30E+05
pH 6.5	R	-	1.000	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	-	8.00E+05	6.81E+05	6.25E+05	6.88E+05
	γ	-	3.200	4.110	3.450	4.290
	T_{150} (h)	-	3.530	2.600	2.270	1.800
	N_0 (UFC/mL)	-	7.87E+05	6.81E+05	6.24E+05	6.88E+05
pH 5.0	R	0.990	1.000	0.999	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	5.80E+05	5.75E+05	6.03E+05	6.13E+05	6.44E+05
	γ	11.030	10.140	4.170	4.660	3.860
	T_{150} (h)	4.160	3.510	1.960	1.620	1.250
	N_0 (UFC/mL)	6.34E+05	5.79E+05	6.02E+05	6.14E+05	6.44E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial

III.6.3. Rifaximina y combinaciones con AE

Las Figuras 33 a 36 presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes de *S. aureus* seleccionados (n=3), como así también para la cepa de referencia ATCC 29213 frente a diferentes concentraciones de rifaximina en CMH a pH 7.4, 6.5 y 5.0. Las curvas control y 0.5 CIM presentaron crecimiento, el ajuste con el modelo de Gompertz fue óptimo, siendo R cercano a 1. Los parámetros obtenidos se presentan en la Tabla 30 para la cepa de referencia y en la Tabla 31 para las cepas salvajes. Al evaluar concentraciones de 2, 4 y 8 CIM de rifaximina se observó muerte bacteriana y se aplicó el modelo sigmoideal. Este modelo tuvo un buen ajuste con valores de R próximos a 1 tanto para la cepa de referencia (Tabla 32) como para las cepas salvajes (Tabla 33). En cuanto a la concentración de 1 CIM se registró una caída del inóculo bacteriano para la cepa de referencia a pH 7.5 y 6.5, pero a pH 5.0 hubo un leve crecimiento, aunque no se logró un buen ajuste con el modelo de Gompertz. Para los aislados salvajes con concentraciones equivalentes a 1 CIM a pH 7.4 hubo una caída del recuento bacteriano, aunque a pH 6.5 y 5.0 se observó un incremento de este.

Luego, al igual que para cloxacilina, se construyeron curvas de muerte bacteriana para las combinaciones AE-rifaximina (Figuras 37 a 40). Los valores de CIM utilizados fueron los que presentaron mayor sinergismo. Estos se presentan en la Tabla 15 de la sección III.5.2. Las curvas control a pH 7.4, 6.5 y 5.0 presentaron un buen ajuste con el modelo de Gompertz para la cepa de referencia (Tabla 34) y las cepas salvajes (Tabla 35). En el caso de 0.5 CIM para todas las cepas y pHs se observó crecimiento (con excepción de lo ocurrido a pH 6.5 para las cepas salvajes), aunque no fue posible obtener un buen ajuste con los modelos evaluados. Con concentraciones correspondientes a 1, 2, 4 y 8 CIM se logró ajustar de manera adecuada el modelo sigmoideal para la cepa de referencia (Tabla 36) y las salvajes (Tabla 37).

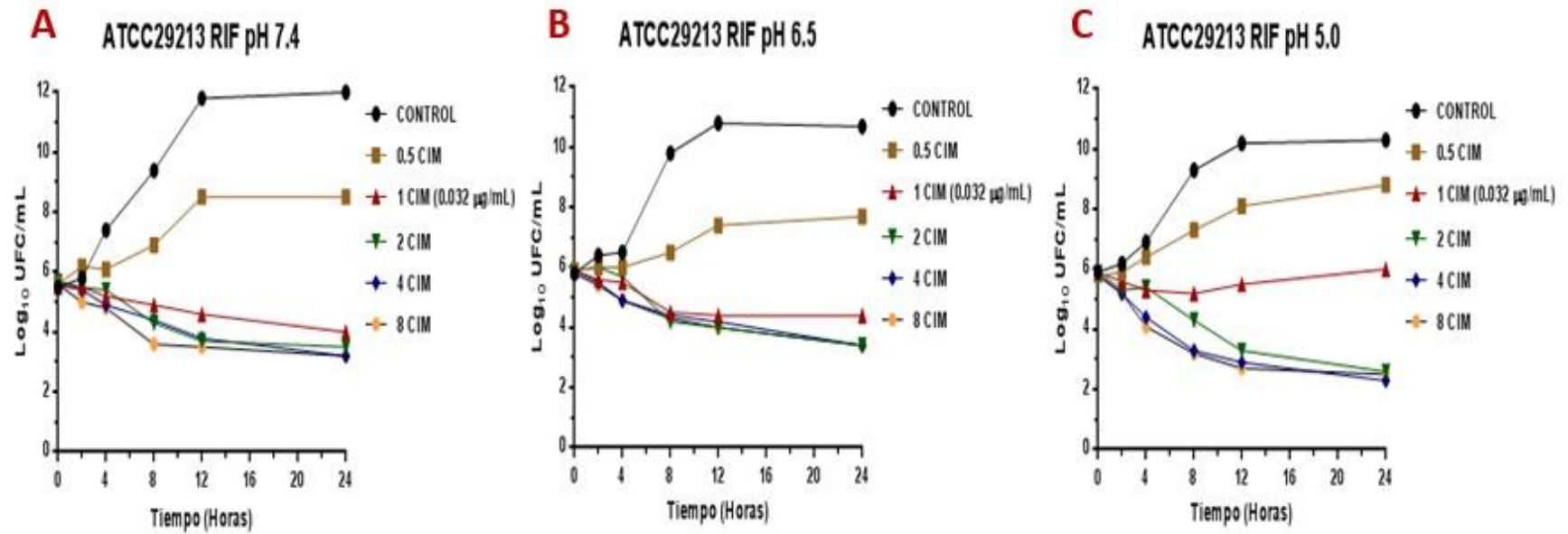


Figura 33. Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

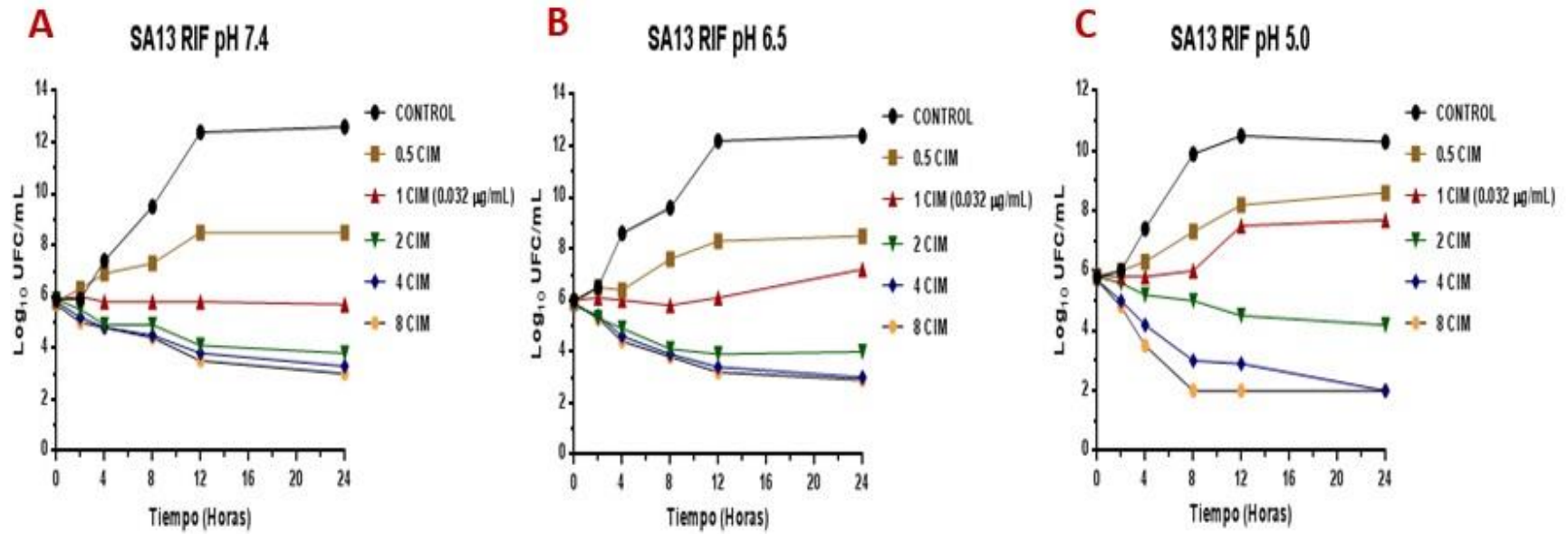


Figura 34. Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

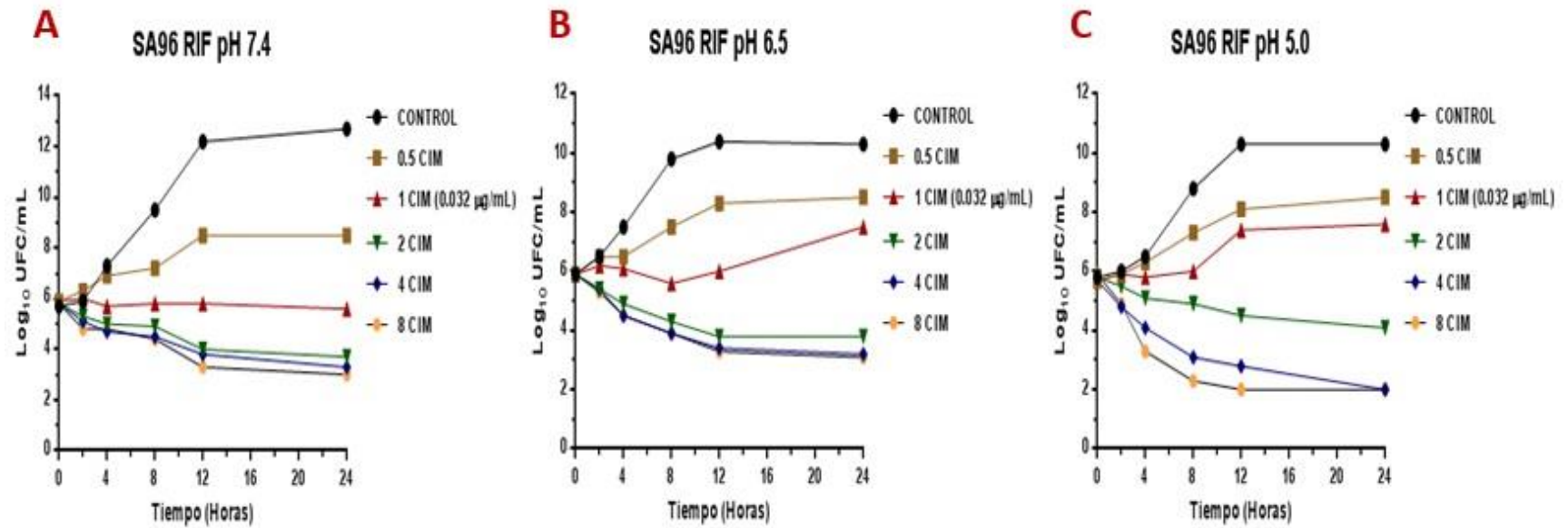


Figura 35. Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

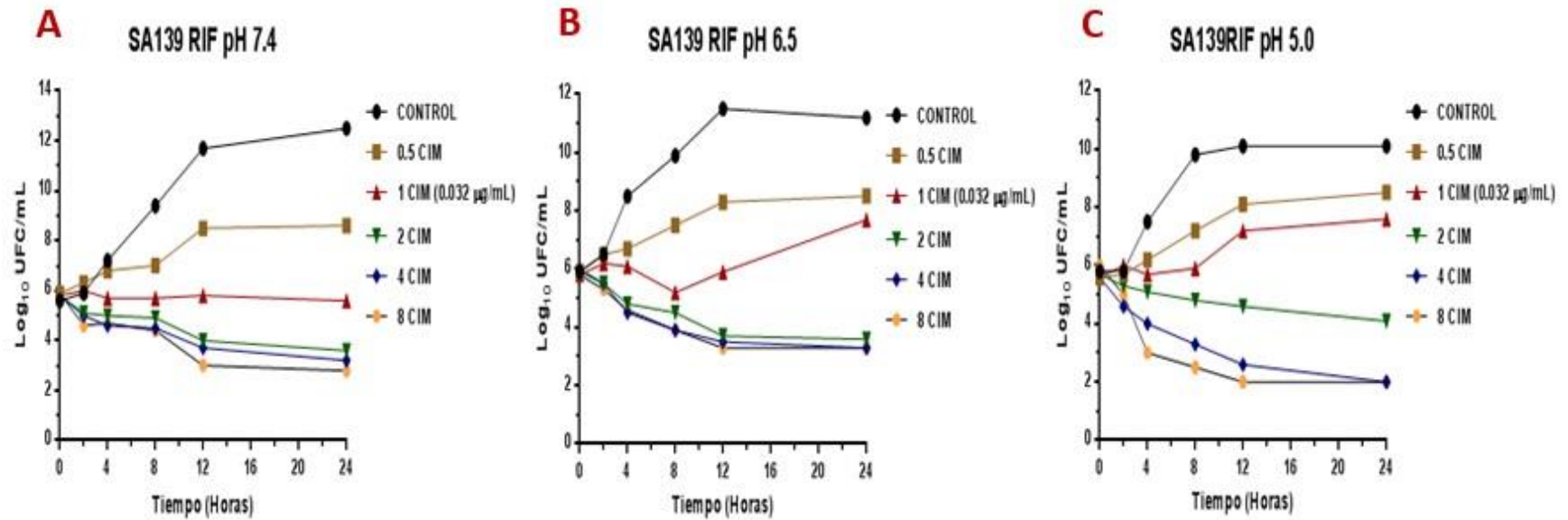


Figura 36. Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

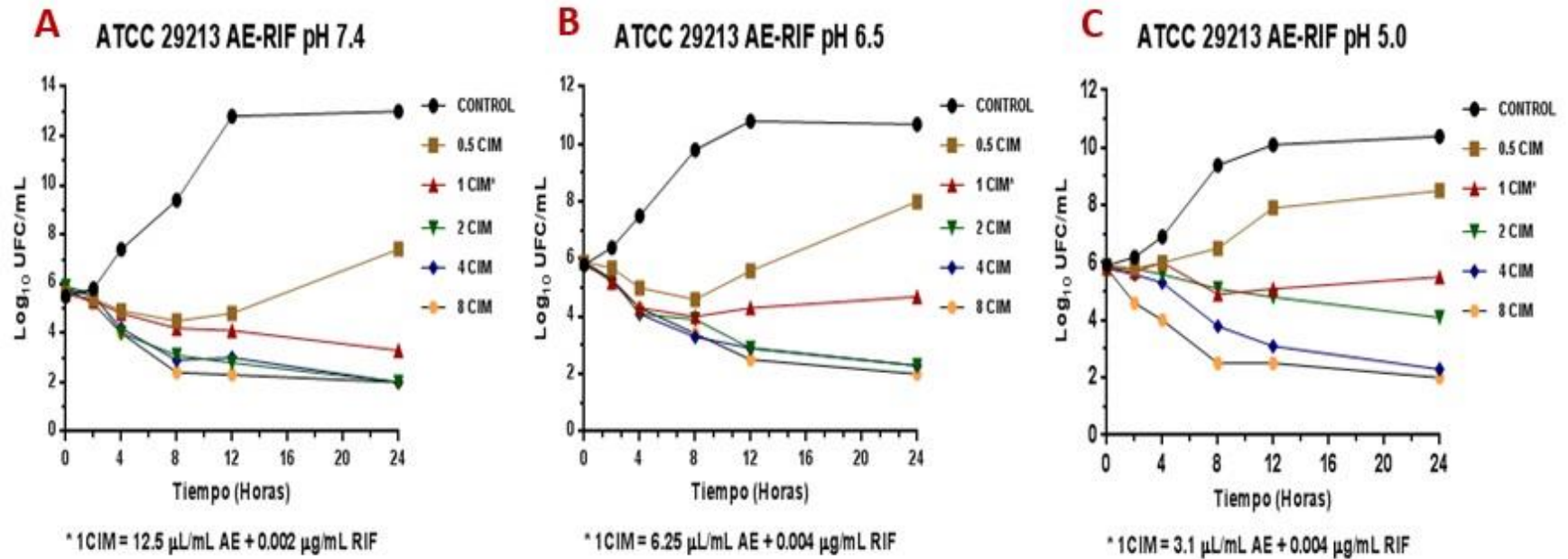


Figura 37. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y rifaximina (AE-RIF) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

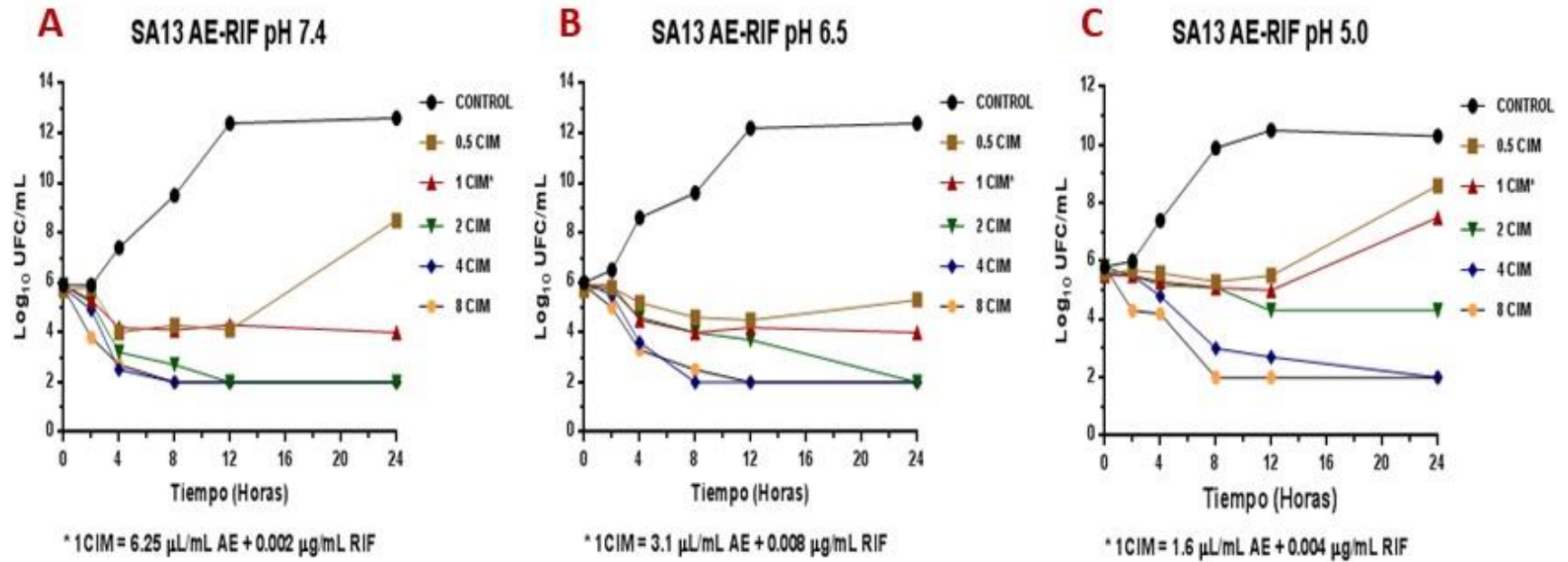


Figura 38. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y rifaximina (AE-RIF) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

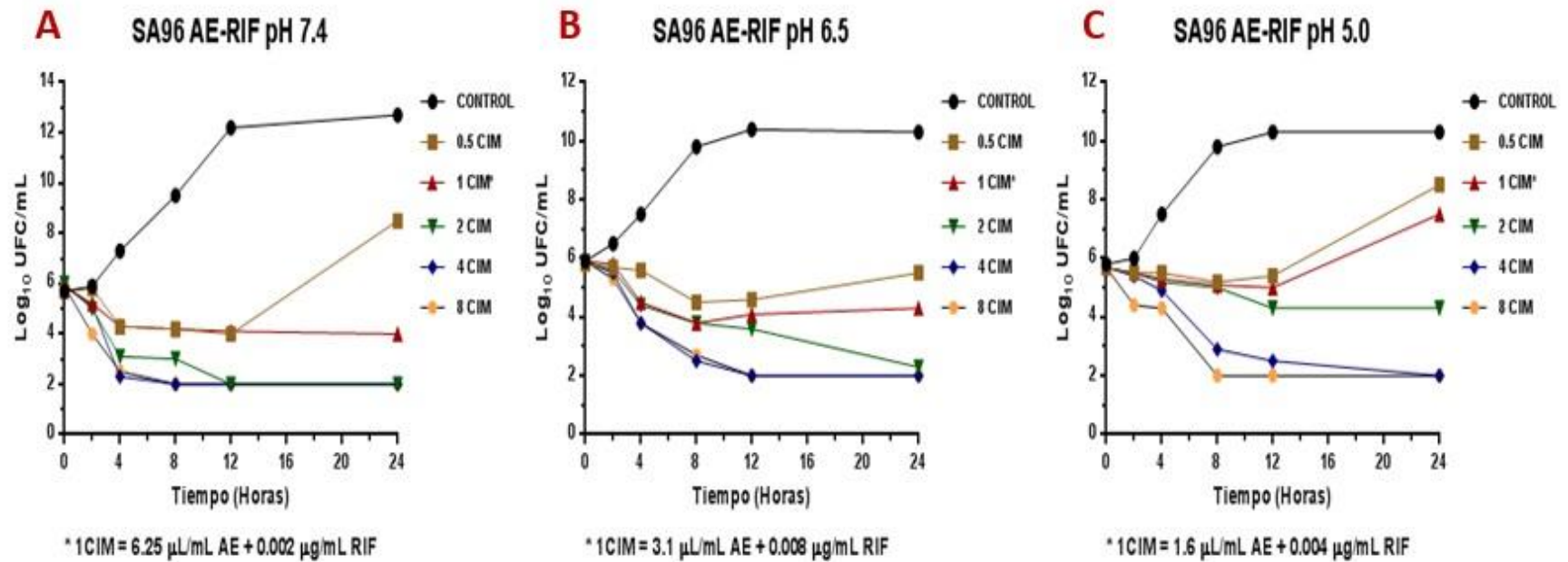


Figura 39. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y rifaximina (AE-RIF) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

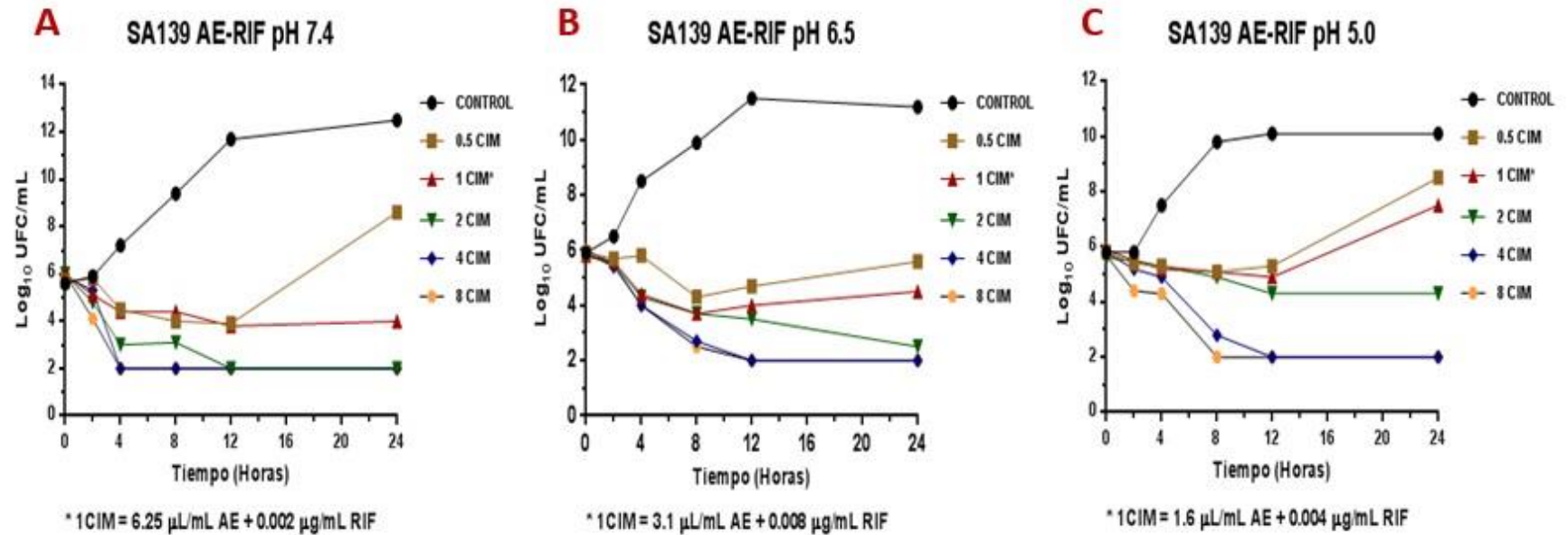


Figura 40. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y rifaximina (AE-RIF) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Tabla 30. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina.

Parámetro	pH 7.4			pH 6.5			pH 5.0		
	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM
R	0.993	0.988	-	0.997	0.999	-	0.997	0.999	0.000
μ (UFC/mL*h)	0.734	0.733	-	0.998	0.263	-	0.642	0.302	-65.974
LPD (h)	1.778	6.893	-	3.769	5.696	-	2.434	2.428	-15.200
MPD (UFC/mL)	12.188	8.164	-	10.794	7.692	-	10.369	8.913	5.671

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 31. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina.

Parámetro	pH 7.4			pH 6.5			pH 5.0		
	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM
R	0.992	0.967	-	1.000	0.990	0.000	1.000	1.000	0.995
μ (UFC/mL*h)	0.821	0.514	-	0.677	0.254	-108.233	0.757	0.287	0.397
LPD (h)	1.663	5.004	-	1.483	1.461	2.251	2.227	2.362	7.379
MPD(UFC/mL)	11.785	8.576	-	11.071	8.599	8.003	10.337	8.574	7.634

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 32. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina.

Parámetro		1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	1.000	0.985	0.999	0.997
	N_{max} (UFC/mL)	3.27E+05	5.62E+05	4.40E+05	4.49E+05
	γ	2.410	1.520	2.360	0.990
	T_{150} (h)	4.100	3.080	2.120	0.790
	N_0 (UFC/mL)	3.43E+05	5.17E+05	4.41E+05	4.28E+05
pH 6.5	R	0.990	0.991	0.999	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	8.31E+05	8.93E+05	8.11E+05	6.75E+05
	γ	1.400	1.550	2.490	2.180
	T_{150} (h)	2.400	2.450	1.580	1.540
	N_0 (UFC/mL)	7.93E+05	8.34E+05	8.18E+05	6.77E+05
pH 5.0	R	-	0.979	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	-	1.12E+06	6.47E+05	6.79E+05
	γ	-	0.390	2.890	3.710
	T_{150} (h)	-	1.920	1.310	1.380
	N_0 (UFC/mL)	-	7.90E+05	6.47E+05	6.80E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial

Tabla 33. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina.

Parámetro		1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	0.930	0.998	0.999	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	2.07E+05	7.13E+05	6.43E+05	6.78E+05
	γ	47.680	1.440	1.350	0.490
	T_{150} (h)	3.490	1.130	0.740	0.170
	N_0 (UFC/mL)	7.92E+05	6.90E+05	6.40E+05	6.20E+05
pH 6.5	R	-	0.999	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	-	8.13E+05	8.14E+05	7.81E+05
	γ	-	2.850	3.630	3.190
	T_{150} (h)	-	1.730	1.650	1.460
	N_0 (UFC/mL)	-	8.20E+05	8.17E+05	7.82E+05
pH 5.0	R	-	0.999	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	-	6.03E+05	4.80E+05	8.00E+05
	γ	-	1.680	2.520	4.790
	T_{150} (h)	-	1.890	1.060	1.050
	N_0 (UFC/mL)	-	6.10E+05	4.80E+05	8.00E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial.

Tabla 34. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina-AE.

Parámetro	pH 7.4		pH 6.5		pH 5.0	
	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM
R	0.994	0.000	0.998	0.00	0.999	1.000
μ (UFC/mL*h)	0.737	-16.383	0.701	-91.909	0.674	0.376
LPD (h)	1.793	-0.992	2.475	-14.373	2.542	6.214
MPD (UFC/mL)	12.204	8.344	10.838	9.154	10.399	8.528

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 35. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina-AE.

Parámetro	pH 7.4		pH 6.5		pH 5.0	
	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM
R	0.990	0.160	1.000	-	1.000	0.000
μ (UFC/mL*h)	0.821	-2.277	0.639	-	0.785	-40.395
LPD (h)	1.663	3.743	2.788	-	1.822	-24.018
MPD (UFC/mL)	11.785	5.749	9.859	-	10.170	9.323

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 36. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina-AE.

Parámetro		1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	1.000	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	3.73E+05	7.15E+05	6.48E+05	5.74E+05
	γ	2.780	6.310	5.370	4.710
	T_{150} (h)	2.120	2.020	2.030	1.660
	N_0 (UFC/mL)	3.79E+05	7.15E+05	6.48E+05	5.74E+05
pH 6.5	R	1.000	0.999	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	7.94E+05	6.75E+05	6.94E+05	7.16E+05
	γ	27.690	4.750	4.550	3.570
	T_{150} (h)	1.890	1.670	1.680	1.470
	N_0 (UFC/mL)	8.17E+05	6.78E+05	6.95E+05	7.16E+05
pH 5.0	R	0.120	0.999	0.997	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	6.23E+05	7.01E+05	6.33E+05	5.72E+05
	γ	-0.180	2.230	2.300	2.320
	T_{150} (h)	0.000	4.440	2.930	0.680
	N_0 (UFC/mL)	4.05E+05	6.92E+05	6.11E+05	5.72E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidicidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial.

Tabla 37. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para las cepas salvajes a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina-AE.

Parámetro		0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	-	1.000	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	-	8.37E+05	9.50E+05	7.60E+05	8.39E+05
	γ	-	5.640	8.090	9.440	7.690
	T_{150} (h)	-	1.600	1.610	1.530	1.310
	N_0 (UFC/mL)	-	8.50E+05	9.50E+05	7.60E+05	8.39E+05
pH 6.5	R	0.920	1.000	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	4.79E+05	7.04E+05	7.88E+05	8.40E+05	8.10E+05
	γ	355.460	8.460	4.960	6.110	5.530
	T_{150} (h)	4.000	2.480	1.990	1.800	1.590
	N_0 (UFC/mL)	6.13E+05	7.20E+05	7.91E+05	8.40E+05	8.10E+05
pH 5.0	R	-	-	0.995	0.999	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	-	-	5.09E+05	5.23E+05	5.49E+05
	γ	-	-	1.680	2.280	0.700
	T_{150} (h)	-	-	2.870	1.720	0.040
	N_0 (UFC/mL)	-	-	5.10E+05	5.13E+05	5.40E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial.

III.6.4. Eritromicina y combinaciones con AE

Las Figuras 41 a 47 presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes de *S. aureus* frente a eritromicina a pH 7.4, 6.5 y 5.0 en CMH. Se utilizaron 3 aislamientos sensibles (SA13, SA96 y SA139), 3 resistentes (SA78A, SA79A y SA86B) y la cepa de referencia ATCC 29213.

Posteriormente, al igual que para los antibióticos anteriores, se construyeron curvas de muerte bacteriana para las combinaciones AE-eritromicina (Figuras 48 a 54). Los valores de CIM utilizados fueron los que presentaron mayor sinergismo. Estos se presentan en la Tabla 17 de la sección III.5.3.

Las curvas de muerte bacteriana obtenidas para eritromicina y su combinación con el AE también fueron modelizadas con los modelos previamente descritos. Los aislamientos salvajes fueron agrupados en función de la similitud en su comportamiento cinético, ya que para los aislamientos resistentes no se evaluaron concentraciones superiores a 4 CIM a pH 7.4, y a 2 CIM a pH 6.5 y 5.0. La Tabla 38 resume los parámetros obtenidos al aplicar el modelo de Gompertz para el crecimiento bacteriano producido en ausencia (control) y presencia de 0.5 CIM de eritromicina para la cepa ATCC 29213 a los 3 pHs ensayados. A pH 5.0, con concentraciones de 1 CIM, se observó un ligero crecimiento por lo que también se utilizó el modelo de Gompertz. En la Tabla 39 se exponen los mismos parámetros analizados anteriormente para los aislamientos salvajes sensibles a eritromicina (SA13-SA96-SA139), y en la Tabla 40 para los aislamientos salvajes resistentes a este macrólido (SA78A-SA79A-SA86B).

Las Tablas 41, 42 y 43 muestran los parámetros obtenidos al aplicar el modelo sigmoideal para las diferentes condiciones (pH y concentración de antimicrobiano) que produjeron disminución en el inóculo bacteriano (cepa ATCC 29213, aislamientos salvajes sensibles a eritromicina (SA13-SA96-SA139) y aislamientos salvajes resistentes a eritromicina (SA78A-SA79A-SA86B) luego de 24 horas de exposición.

Al modelizar los datos obtenidos por efecto de la combinación de eritromicina con el AE se logró obtener un buen ajuste para las curvas control mediante el

modelo de Gompertz en todas las condiciones y aislamientos. Las Tablas 44, 45 y 46 muestran los resultados de la aplicación del modelo de Gompertz en las condiciones en las que se registró crecimiento para la cepa de referencia ATCC 29213, aislamientos salvajes sensibles a eritromicina (SA13-SA96-SA139) y aislamientos salvajes resistentes a eritromicina (SA78A-SA79A-SA86B) respectivamente. Mientras que en las Tablas 47, 48 y 49 se presentan los parámetros obtenidos por la modelización de las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos mencionadas anteriormente.

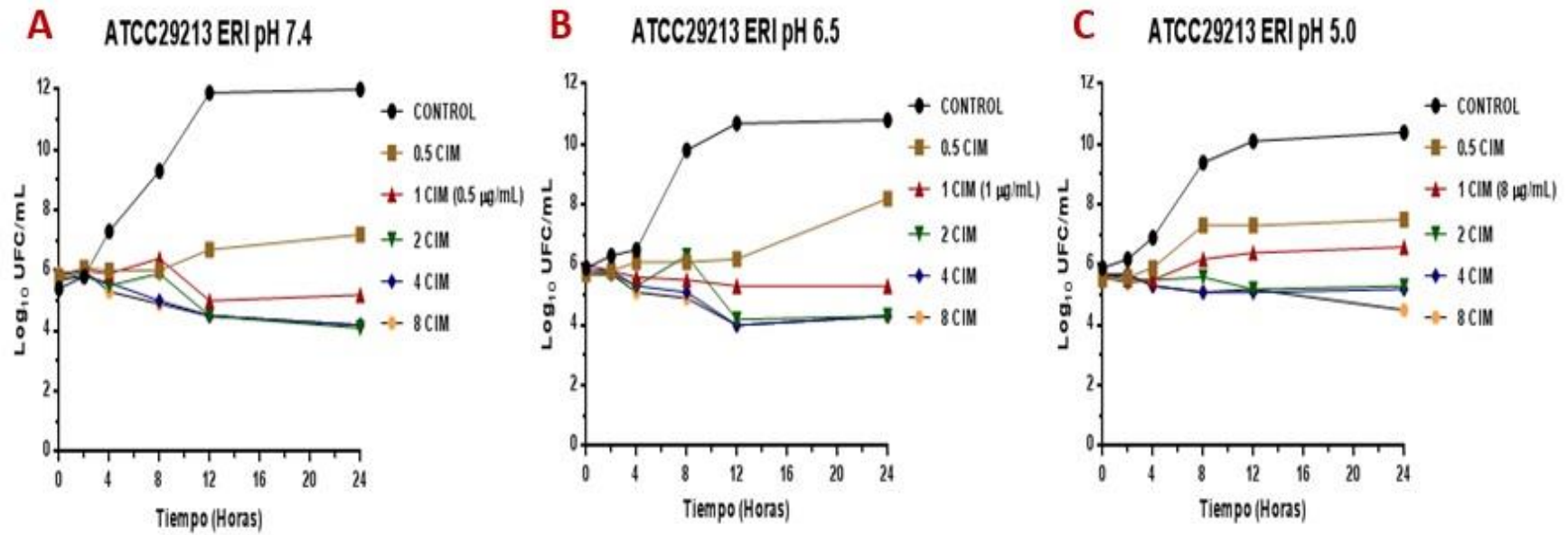


Figura 41. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

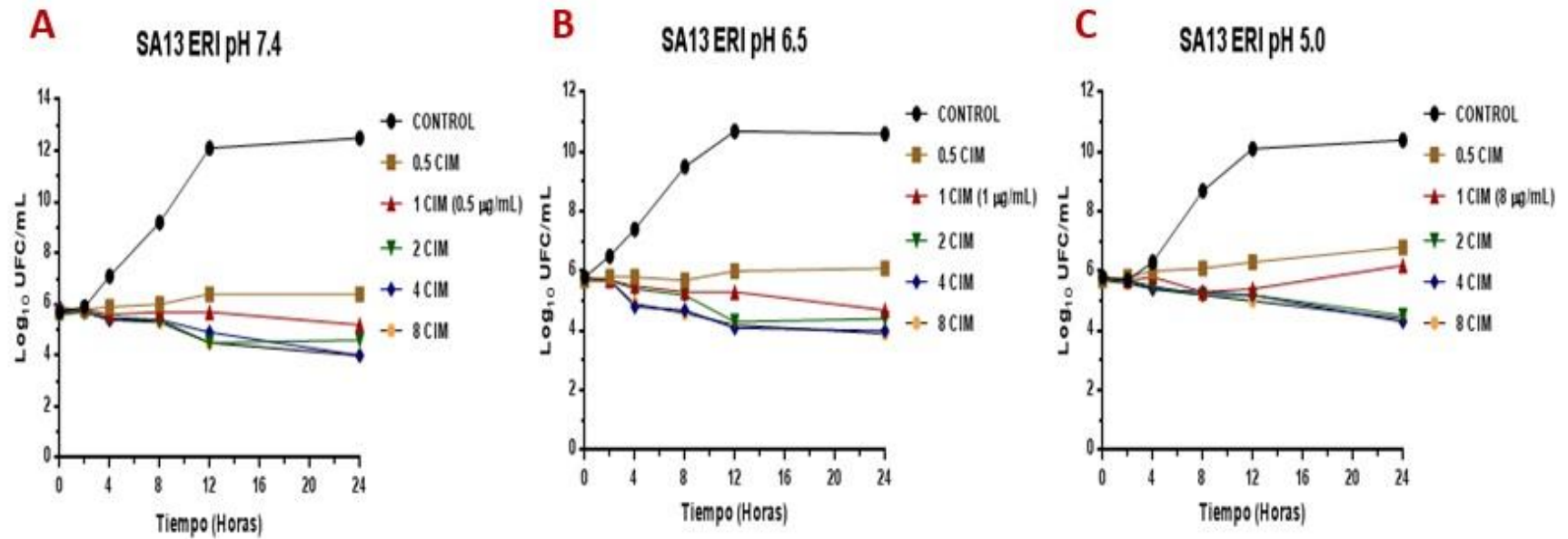


Figura 42. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

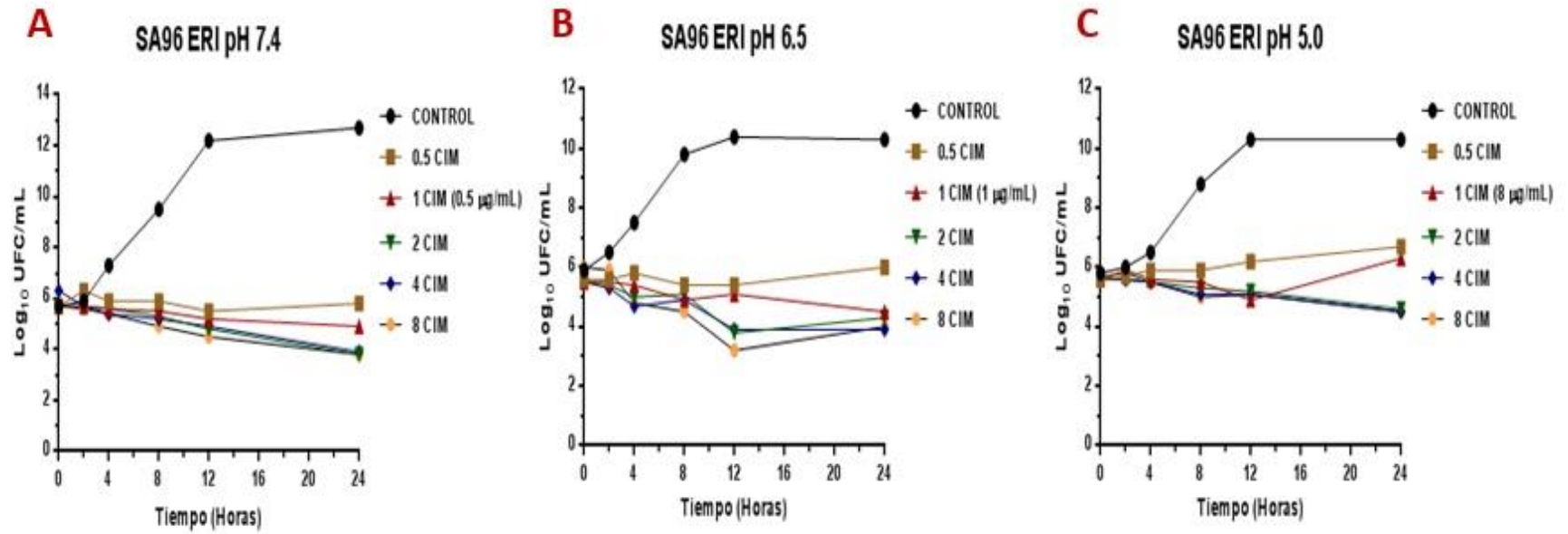


Figura 43. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

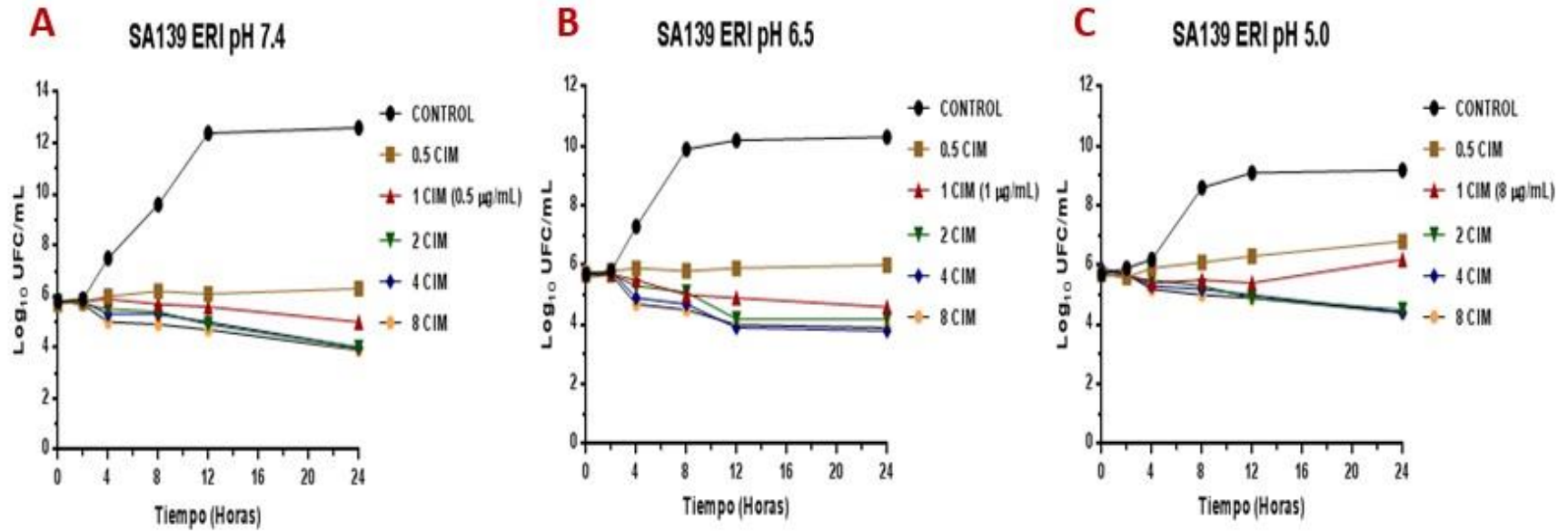


Figura 44. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

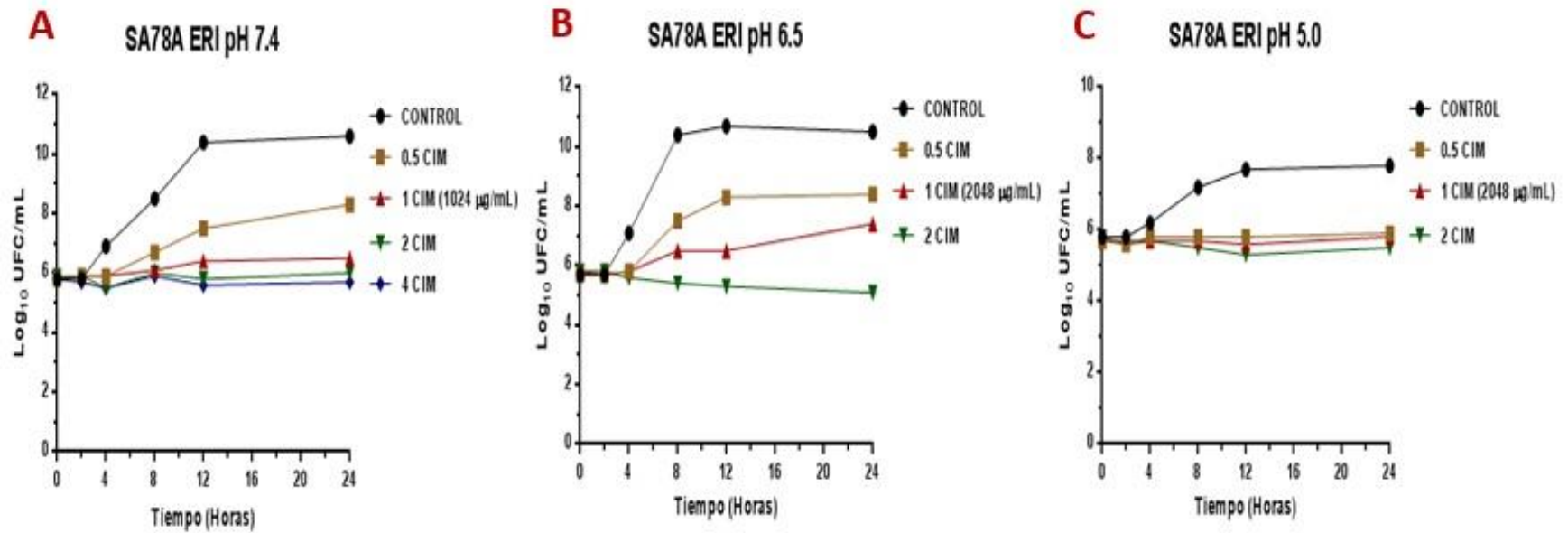


Figura 45. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA78A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

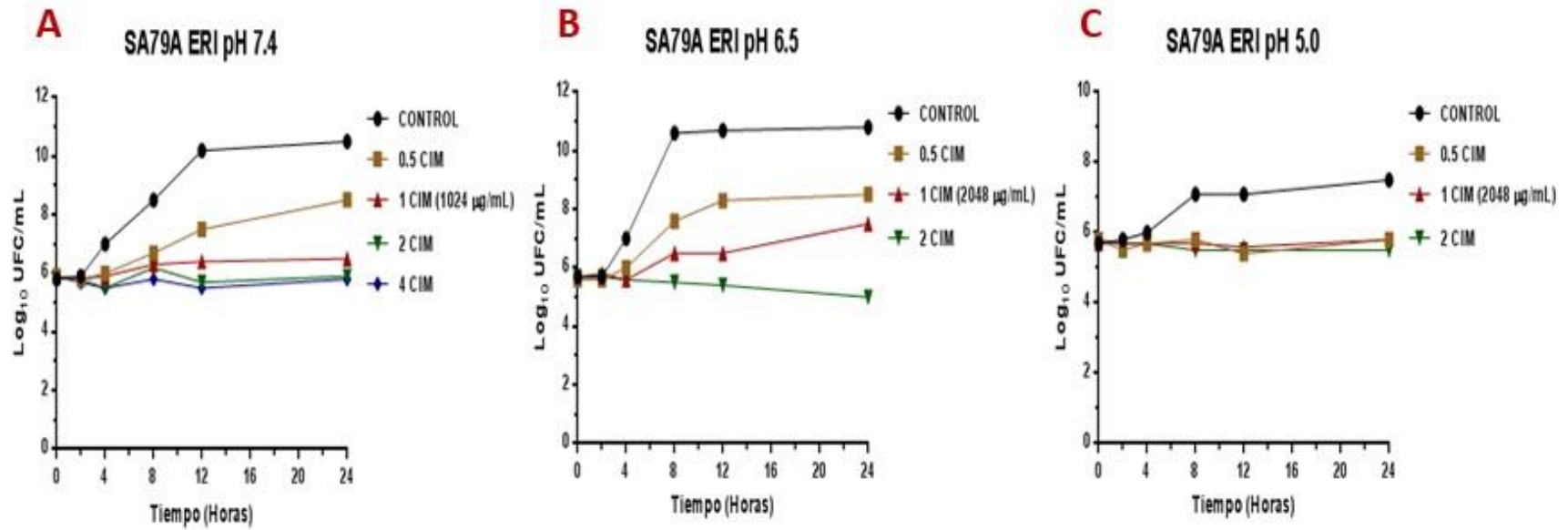


Figura 46. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA79A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

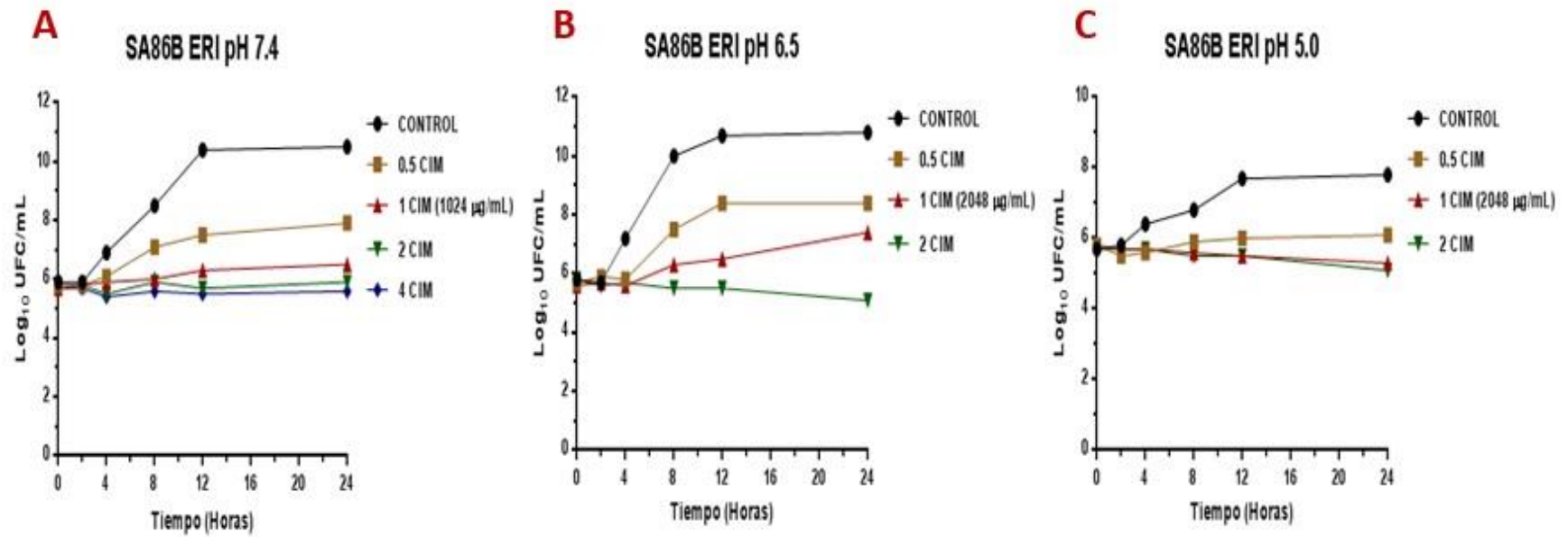


Figura 47. Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA86B a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

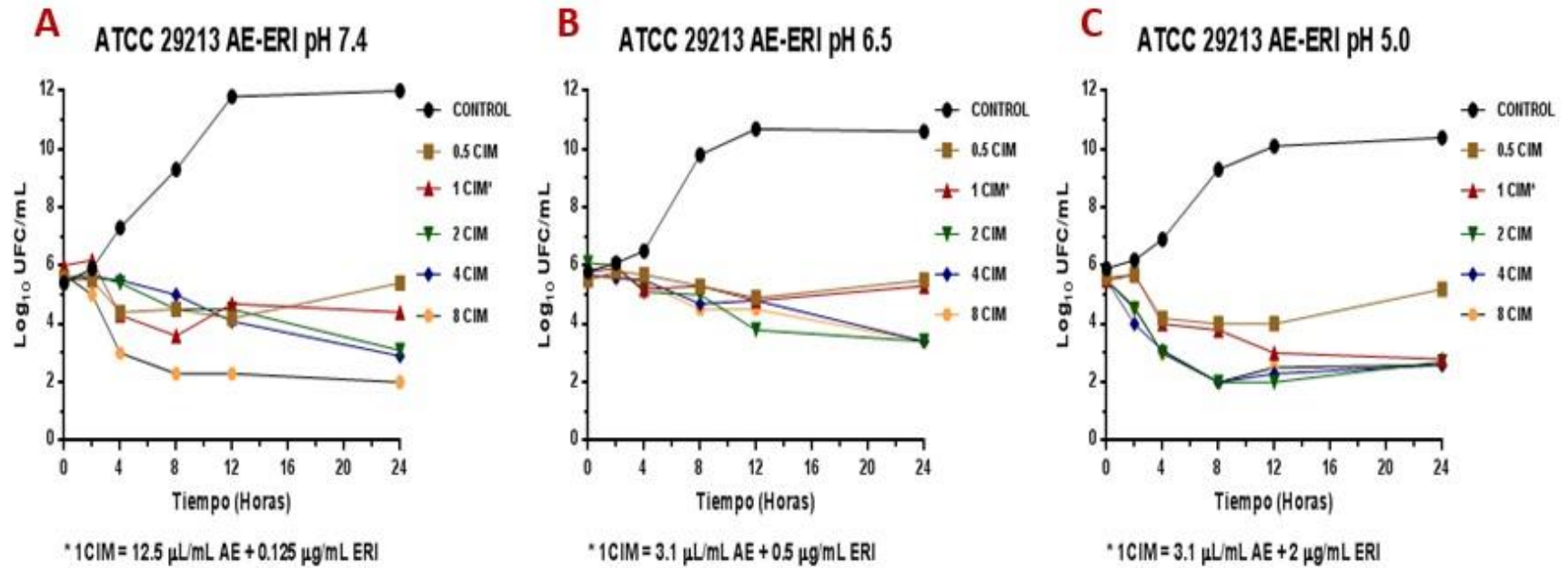


Figura 48. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

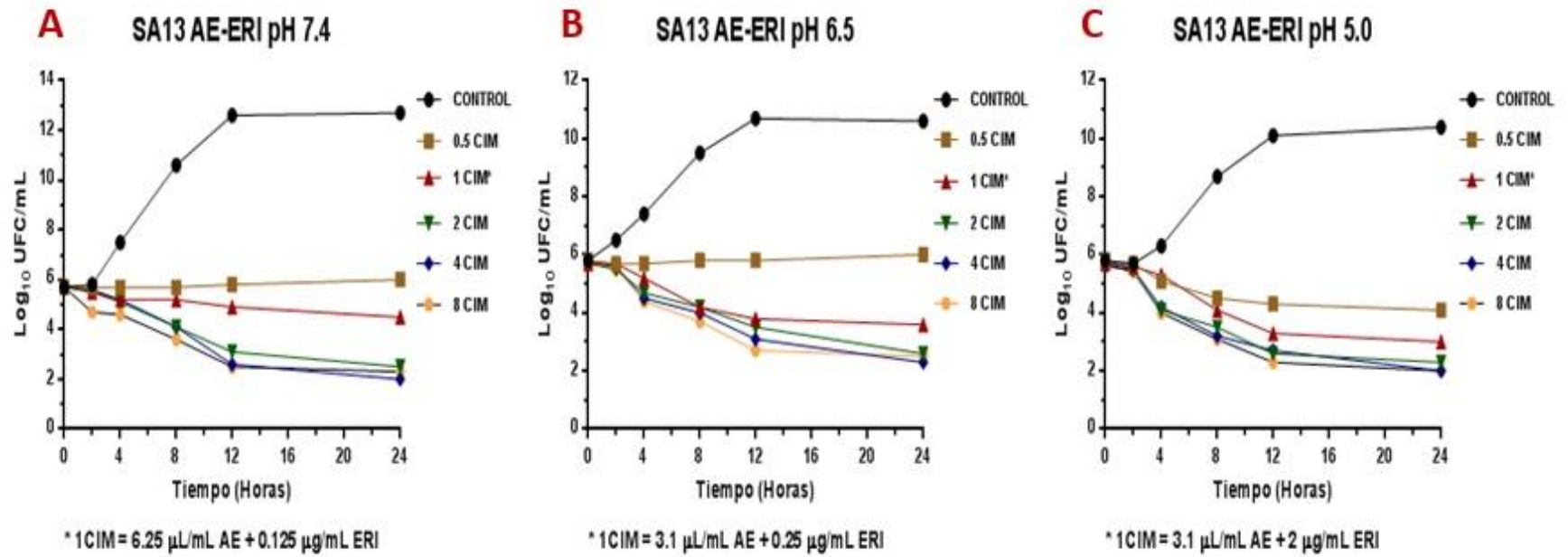


Figura 49. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

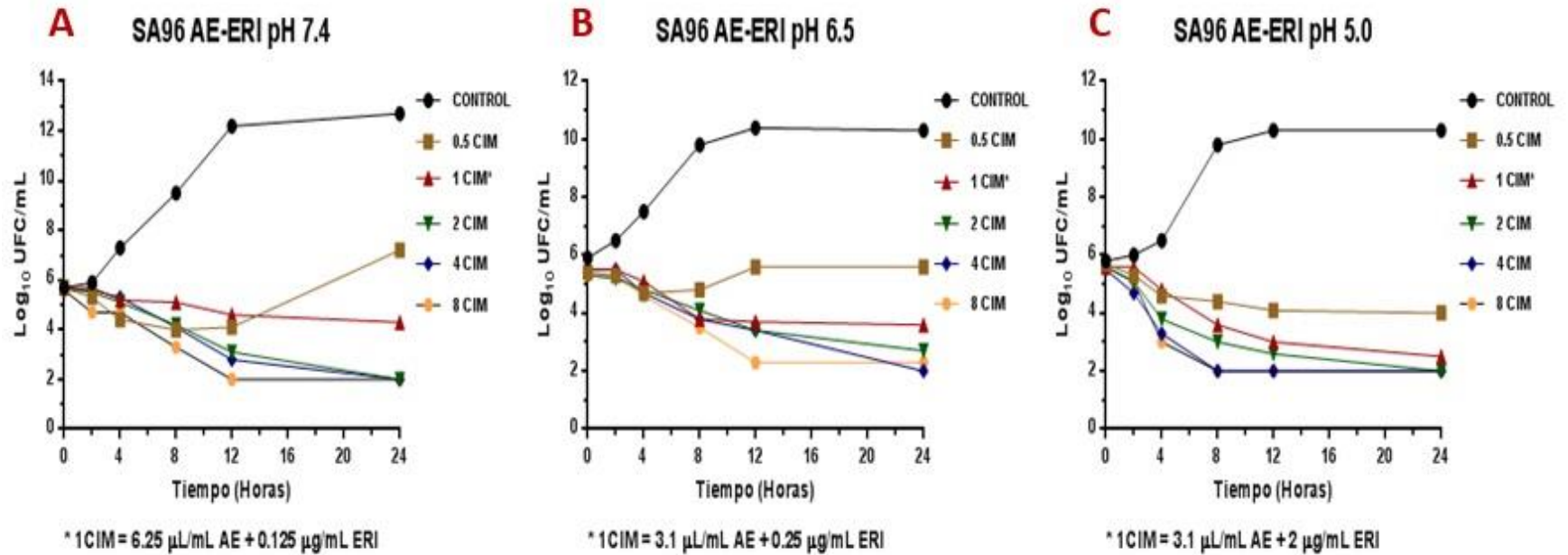


Figura 50. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

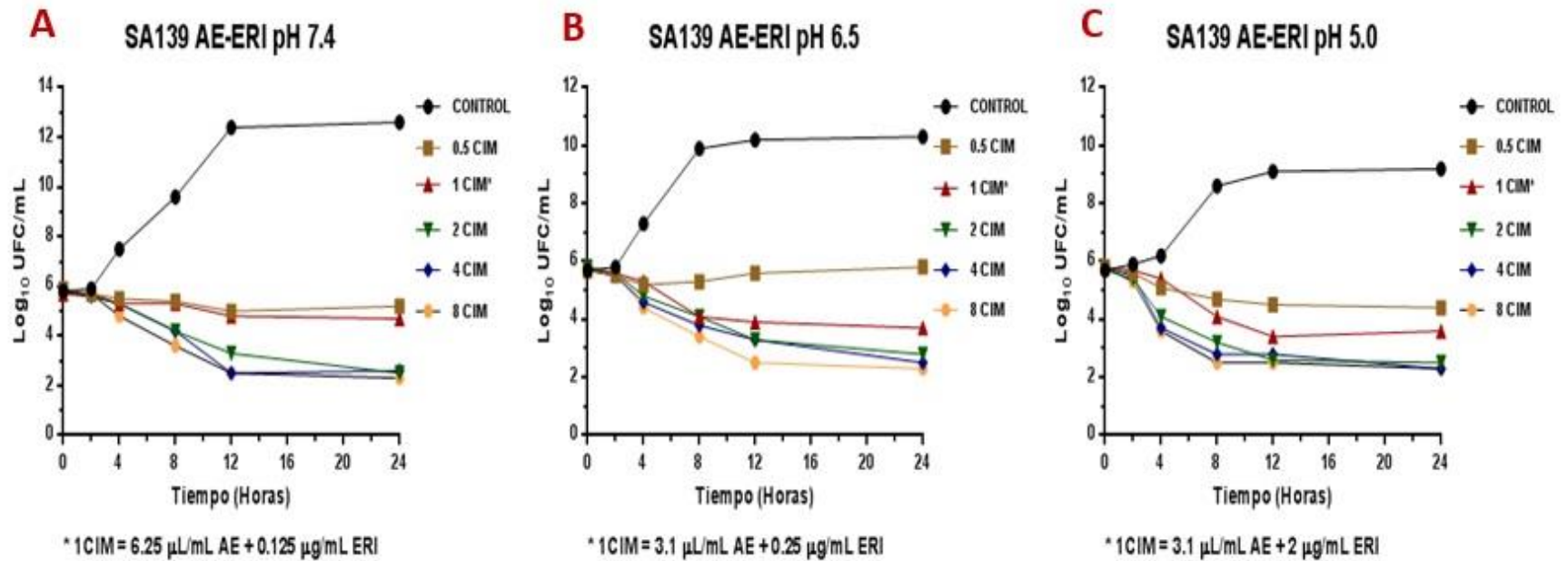


Figura 51. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

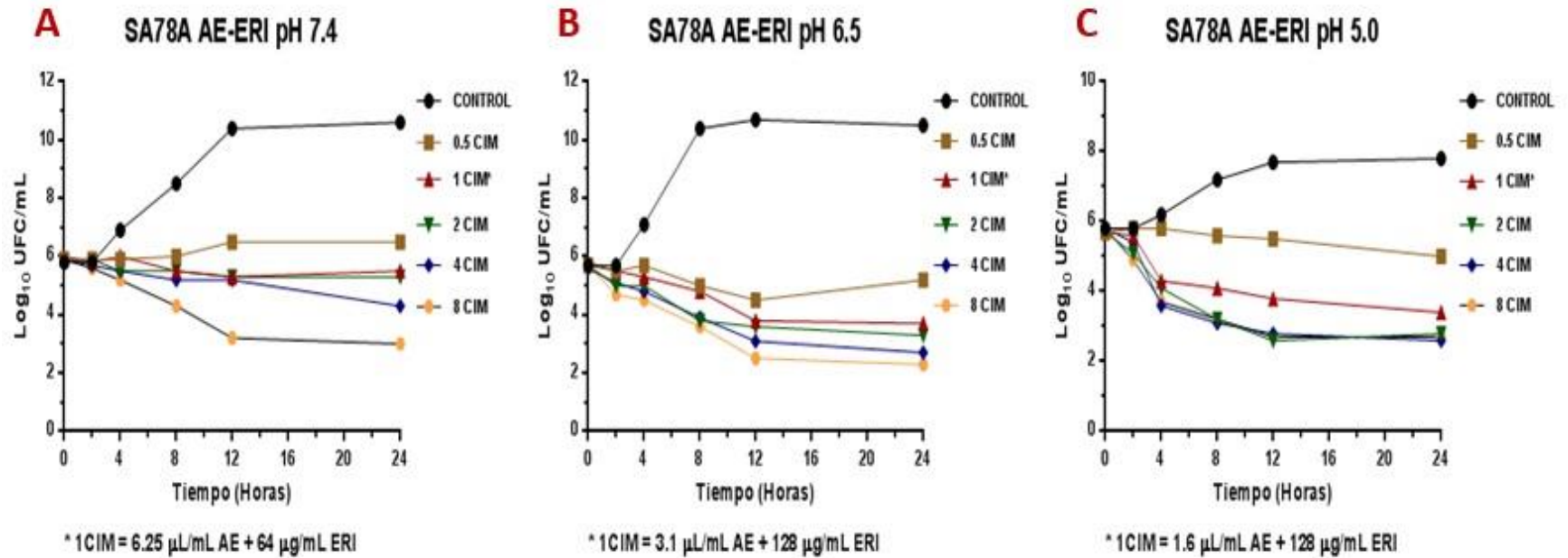


Figura 52. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA78A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

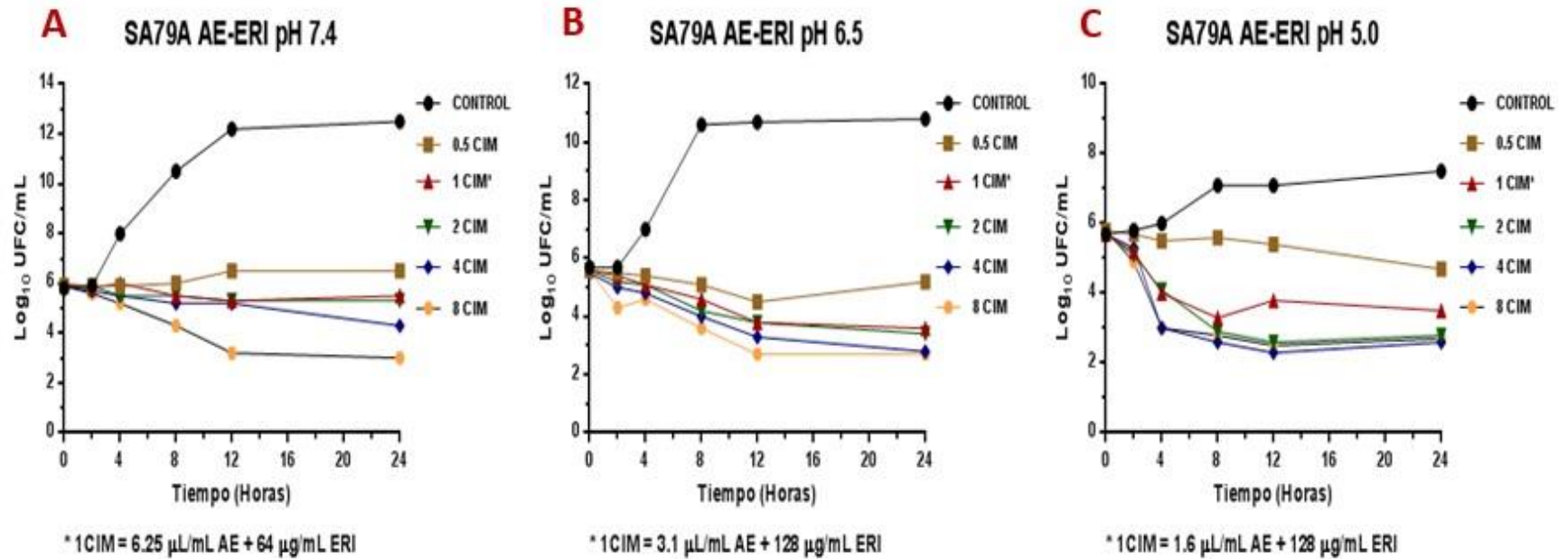


Figura 53. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA79A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

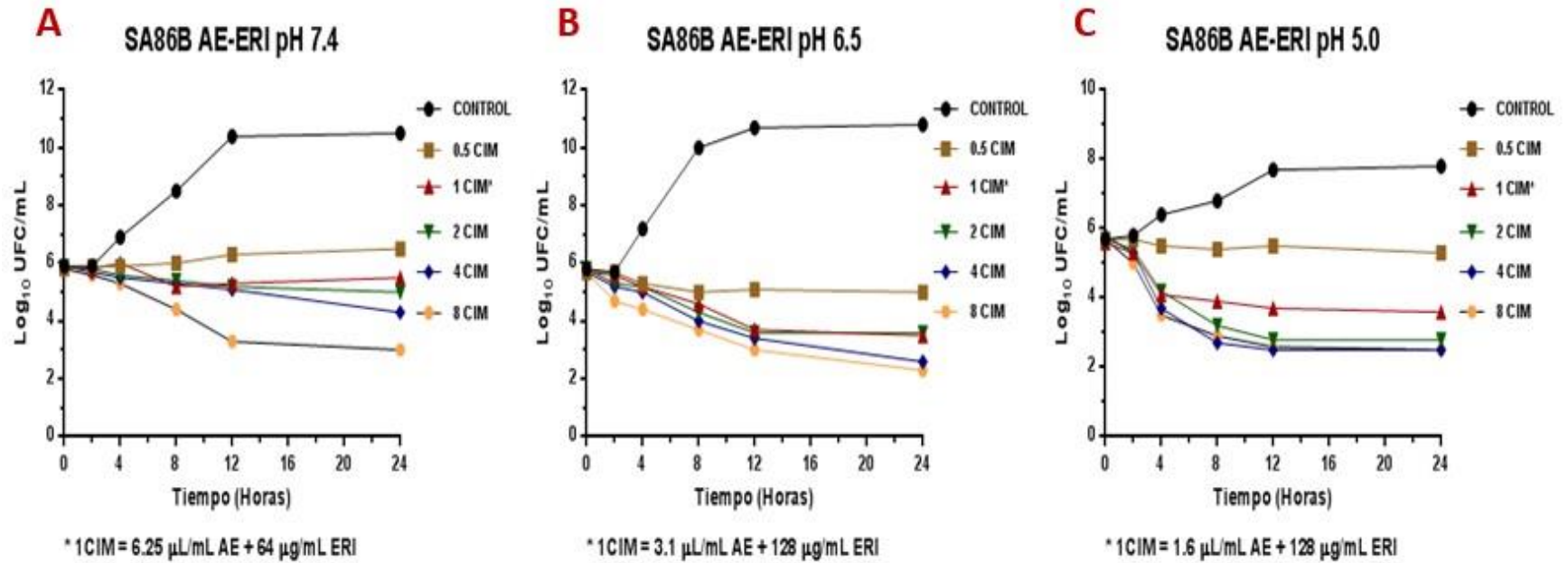


Figura 54. Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de AE y eritromicina (AE-ERI) frente a SA86B a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

Tabla 38. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Parámetro	pH 7.4			pH 6.5			pH 5.0		
	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM
R	0.995	0.977	-	0.997	0.989	-	1.000	0.998	0.986
μ (UFC/mL*h)	0.674	0.189	-	0.999	0.922	-	0.673	0.455	0.198
LPD (h)	1.406	7.974	-	3.758	10.554	-	2.540	3.208	4.610
MPD (UFC/ mL)	11.798	7.180	-	10.756	8.176	-	10.399	7.462	6.535

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 39. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para los asilamientos salvajes sensibles (SA13-SA96-SA139) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Parámetro	pH 7.4			pH 6.5			pH 5.0		
	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM
R	0.993	0.788	-	0.999	0.709	-	0.999	0.984	0.418
μ (UFC/mL*h)	0.765	-2.702	-	0.827	0.188	-	0.720	0.120	13731.361
LPD (h)	2.452	2.497	-	1.849	0.283	-	3.540	3.679	-24149.985
MPD (UFC/mL)	12.849	6.118	-	10.466	5.807	-	10.161	6.930	6.132

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 40. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para los aislamientos salvajes resistentes (SA78A-SA79A-SA86B) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Parámetro	pH 7.4			pH 6.5			pH 5.0		
	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM	Control	0.5 CIM	1 CIM
R	0.994	0.695	0.992	1.000	0.591	0.983	0.994	0.915	0.682
μ (UFC/mL*h)	0.554	0.234	0.085	1.517	0.510	0.119	0.293	0.083	0.838
LPD (h)	2.453	3.731	4.028	2.984	4.199	2.629	2.454	4.857	15.880
MPD (UFC/mL)	10.663	8.286	6.510	10.688	8.427	7.585	7.641	5.958	5.679

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 41. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Parámetro		1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	0.964	0.881	0.995	0.989
	N_{max} (UFC/mL)	6.70E+05	5.85E+05	5.44E+05	7.95E+05
	γ	7.174	3.210	3.902	32.007
	T_{150} (h)	6.528	5.110	4.768	3.831
	N_0 (UFC/mL)	7.90E+05	6.15E+05	5.65E+05	8.35E+05
pH 6.5	R	1.000	0.964	0.988	0.994
	N_{max} (UFC/mL)	7.17E+05	5.28E+05	5.27E+05	4.76E+05
	γ	2.339	1.829	7.689	5.747
	T_{150} (h)	3.922	3.905	3.485	3.111
	N_0 (UFC/mL)	9.01E+05	5.31E+05	5.78E+05	5.12E+05
pH 5.0	R	-	0.218	0.997	0.978
	N_{max} (UFC/mL)	-	1.96E+04	3.10E+05	3.75E+05
	γ	-	-0.158	31.712	29.753
	T_{150} (h)	-	0.000	3.835	3.851
	N_0 (UFC/mL)	-	2.78E+05	4.45E+05	4.75E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial

Tabla 42. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para los aislamientos salvajes sensibles (SA13-SA96-SA139) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

	Parámetro	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	0.955	0.978	0.991	0.989
	N_{max} (UFC/mL)	4.26E+05	5.66E+05	1.08E+06	5.54E+05
	γ	12.412	2.132	2.183	2.898
	T_{150} (h)	7.843	6.363	2.995	3.795
	N_0 (UFC/mL)	6.07E+05	5.31E+05	1.07E+06	5.65E+05
pH 6.5	R	0.979	0.967	0.986	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	4.44E+05	4.31E+05	4.93E+05	7.17E+05
	γ	5.120	11.436	14.070	6.165
	T_{150} (h)	4.725	4.062	2.840	2.561
	N_0 (UFC/mL)	4.93E+05	4.45E+05	5.18E+05	7.33E+05
pH 5.0	R	-	0.982	0.989	0.988
	N_{max} (UFC/mL)	-	5.12E+05	5.99E+05	4.59E+05
	γ	-	1.925	2.363	2.342
	T_{150} (h)	-	5.708	4.929	4.376
	N_0 (UFC/mL)	-	5.21E+05	5.94E+05	4.88E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial

Tabla 43. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para los aislamientos salvajes resistentes (SA78A-SA79A-SA86B) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

	Parámetro	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	-	-	0.944	-
	N_{max} (UFC/mL)	-	-	2.77E+05	-
	γ	-	-	21.455	-
	T_{150} (h)	-	-	2.180	-
	N_0 (UFC/mL)	-	-	6.63E+05	-
pH 6.5	R	-	0.985	-	-
	N_{max} (UFC/mL)	-	5.59E+05	-	-
	γ	-	1.823	-	-
	T_{150} (h)	-	8.350	-	-
	N_0 (UFC/mL)	-	6.05E+05	-	-
pH 5.0	R	-	0.964	-	-
	N_{max} (UFC/mL)	-	3.53E+05	-	-
	γ	-	1.913	-	-
	T_{150} (h)	-	4.725	-	-
	N_0 (UFC/mL)	-	5.70E+05	-	-

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial

Tabla 44. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina-AE.

Parámetro	pH 7.4		pH 6.5		pH 5.0	
	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM
R	0.995	-	0.997	(NAN)	1.000	-
μ (UFC/mL*h)	0.674	-	0.999	-60.638	0.673	-
LPD (h)	1.406	-	3.758	208.462	2.540	-
MPD (UFC/mL)	11.798	-	10.756	5.464	10.399	-

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 45. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para los aislamientos salvajes sensibles (SA13-SA96-SA139) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina-AE.

Parámetro	pH 7.4		pH 6.5		pH 5.0	
	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM
R	0.993	0.709	1.000	0.754	1.000	-
μ (UFC/mL*h)	0.765	0.756	0.845	4.40E+04	0.825	-
LPD (h)	2.452	7.609	1.962	-1.00E+06	3.539	-
MPD (UFC/mL)	12.849	5.828	10.397	5.545	10.111	-

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 46. Parámetros estimados por el modelo de Gompertz para los aislamientos salvajes resistentes (SA78A-SA79A-SA86B) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina-AE.

Parámetro	pH 7.4		pH 6.5		pH 5.0	
	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM	Control	0.5 CIM
R	0.995	0.739	1.000	-	0.994	-
μ (UFC/mL*h)	0.673	0.157	1.277	-	0.293	-
LPD (h)	2.293	7.541	2.815	-	2.454	-
MPD (UFC/mL)	11.305	6.545	10.659	-	7.641	-

R: Coeficiente de Correlación; μ : velocidad de crecimiento específica; LPD: tiempo de latencia y MPD: máxima densidad de población.

Tabla 47. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para la cepa ATCC 29213 a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina-AE.

Parámetro		0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	0.913	0.942	0.974	0.986	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	3.35E+05	9.51E+05	4.50E+05	3.62E+05	5.30E+05
	γ	29.609	223.339	29.543	24.185	7.199
	T_{150} (h)	4.166	3.950	4.062	4.095	1.633
	N_0 (UFC/mL)	4.25E+05	1.06E+06	4.70E+05	3.70E+05	5.30E+05
pH 6.5	R	-	0.954	0.992	0.993	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	-	5.54E+05	1.27E+06	4.71E+05	3.93E+05
	γ	-	28.743	4.508	2.976	4.139
	T_{150} (h)	-	4.892	4.880	4.753	4.538
	N_0 (UFC/mL)	-	7.30E+05	1.25E+06	4.68E+05	4.02E+05
pH 5.0	R	0.952	0.976	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	3.83E+05	3.87E+05	3.30E+05	3.30E+05	3.40E+05
	γ	69.275	36.232	5.365	3.397	4.159
	T_{150} (h)	3.326	3.324	1.291	0.797	0.808
	N_0 (UFC/mL)	4.40E+05	3.90E+05	3.30E+05	3.30E+05	3.40E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial.

Tabla 48. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para los aislamientos salvajes sensibles (SA13-SA96-SA139) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina-AE.

	Parámetro	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	-	0.986	0.999	0.999	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	-	4.98E+05	5.56E+05	5.17E+05	5.76E+05
	γ	-	12.370	2.703	3.029	1.925
	T_{150} (h)	-	3.451	3.240	3.249	0.905
	N_0 (UFC/mL)	-	5.77E+05	5.45E+05	5.07E+05	5.53E+05
pH 6.5	R	-	0.999	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	-	4.65E+05	4.41E+05	5.24E+05	4.32E+05
	γ	-	12.915	3.841	4.703	5.437
	T_{150} (h)	-	3.508	2.686	2.469	2.472
	N_0 (UFC/mL)	-	4.63E+05	4.43E+05	5.27E+05	4.33E+05
pH 5.0	R	0.997	0.999	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	5.67E+05	5.30E+05	5.16E+05	4.76E+05	5.20E+05
	γ	4.409	3.179	5.551	6.321	6.491
	T_{150} (h)	3.120	2.866	1.969	1.956	1.837
	N_0 (UFC/mL)	5.76E+05	5.25E+05	5.17E+05	4.77E+05	5.20E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial.

Tabla 49. Parámetros estimados por el modelo sigmoideal para los aislamientos salvajes resistentes (SA78A-SA79A-SA86B) a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina-AE.

	Parámetro	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
pH 7.4	R	-	0.968	0.992	0.996	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	-	5.30E+05	6.54E+05	7.72E+05	7.75E+05
	γ	-	39.127	3.267	1.307	1.947
	T_{150} (h)	-	6.427	3.403	3.246	2.197
	N_0 (UFC/mL)	-	7.89E+05	8.32E+05	7.59E+05	7.56E+05
pH 6.5	R	0.960	0.998	0.996	0.998	0.999
	N_{max} (UFC/mL)	3.36E+05	5.45E+05	5.20E+05	4.40E+05	4.73E+05
	γ	28.314	1.990	1.152	1.183	0.726
	T_{150} (h)	5.217	2.648	1.485	1.111	0.182
	N_0 (UFC/mL)	4.55E+05	5.26E+05	4.90E+05	4.20E+05	4.43E+05
pH 5.0	R	0.962	1.000	1.000	1.000	1.000
	N_{max} (UFC/mL)	5.58E+05	4.78E+05	5.46E+05	5.73E+05	5.69E+05
	γ	9.681	5.763	4.173	7.443	5.863
	T_{150} (h)	8.372	2.024	1.723	1.739	1.485
	N_0 (UFC/mL)	5.88E+05	4.83E+05	5.47E+05	5.73E+05	5.70E+05

R: Coeficiente de Correlación; N_{max} : máxima caída de recuento bacteriano; γ : coeficiente de sigmoidealidad; T_{150} : tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima y N_0 : concentración del inóculo inicial.

III.6.5. Evaluación del índice de actividad antibacteriana E y su modelización matemática

Con la evaluación del índice de actividad antibacteriana se pudo comparar la incidencia del AE en la actividad de la cloxacilina, la rifaximina y la eritromicina frente a las cepas (ATCC 29213 y SARM) y aislamientos salvajes de *S. aureus*, además del efecto causado por la variación del pH.

III.6.5.1. Índice E del AE y su modelado matemático

Al evaluar el índice E de actividad antibacteriana para el AE de *M. armillaris* en función del pH del medio encontramos que a menor pH hay una ligera disminución de la concentración necesaria para lograr una misma reducción del inóculo inicial. La Figura 55 muestra estos resultados para la cepa de referencia ATCC 29213 (Figura 55 A) y para los aislamientos salvajes, los cuales fueron agrupados según su valor de CIM a fin de poder graficarlas y modelizar su comportamiento. De este modo se agruparon por un lado las cepas SA13, SA96, SA139 y SARM 5-I (Figura 55 B) y por el otro SA78A, SA79A y SA79B (Figura 55 C).

Los parámetros obtenidos de la modelización matemática se presentan en la Tabla 50. Se puede observar como punto destacado la disminución significativa de la concentración necesaria para obtener la caída del 50% del recuento bacteriano (C_{50}) a medida que el medio se acidifica ($p < 0.01$), observándose para todas las cepas analizadas.

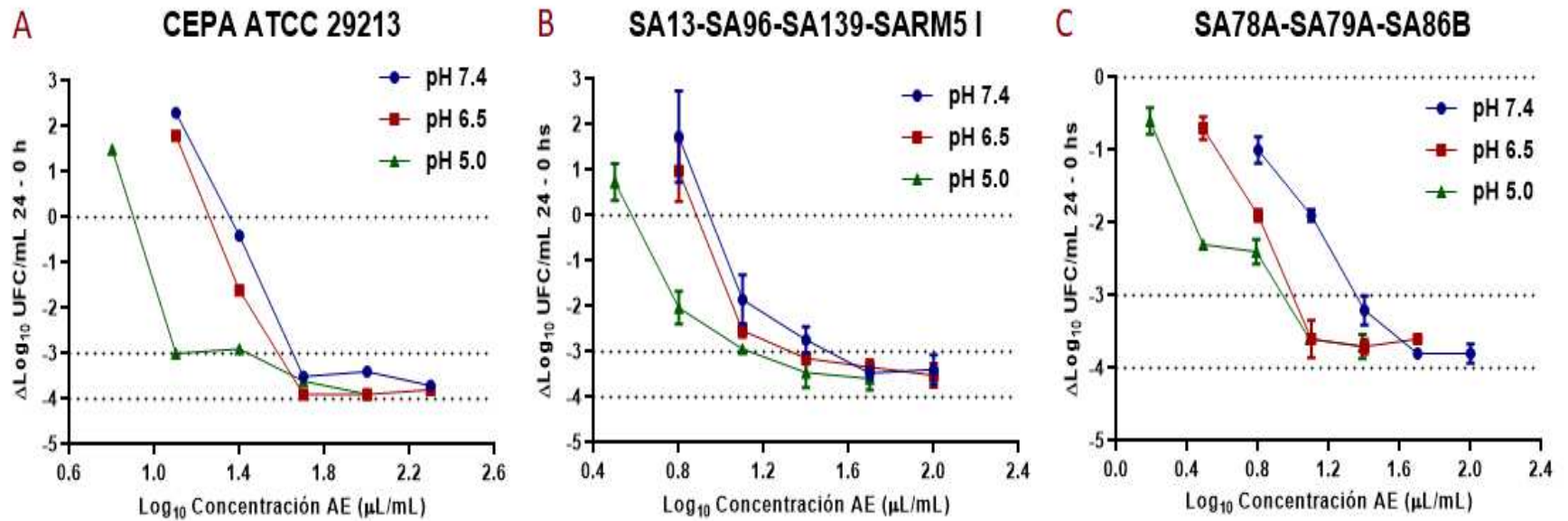


Figura 55. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) del AE de *M. armillaris* a pH 7.4, 6.5, y 5.0 frente a *S. aureus* ATCC 29213 (A); promedio de cepas SA13, SA96, SA139, SARM5-I (B); promedio de cepas SA78A, SA79A, SA86B (C). *Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de concentración inhibitoria mínima (CIM).

Tabla 50. Parámetros estimados por aplicación del modelo sigmoïdal para evaluar el índice de actividad antibacteriana del AE frente a *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

AE	ATCC 29213			Salvajes (13-96-139-SARM 5-I)			Salvajes (78A-79A-86B)		
Parámetro	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0
R	0.998	0.999	0.999	0.999	1.000	0.999	0.998	0.997	0.989
E_{max} (Log ₁₀ UFC/mL)	10.197	8.852	8.629	9.805	8.634	9.030	9.346	8.564	5.481
Υ	2.421	2.126	1.115	2.130	2.130	0.995	0.752	1.412	1.683
C_{50} (μ L/mL)	17.555	11.132	4.559	6.533 ^a	4.448 ^b	1.584 ^c	3.125 ^d	2.279 ^e	1.862 ^e
E_0 (Log ₁₀ UFC/mL)	6.355	4.897	4.503	5.526	5.131	5.045	4.697	4.627	1.919

Modelo sigmoïdal. E_0 : Índice E en ausencia de AE, E_{max} : máxima reducción del recuento bacteriano, C_{50} : concentración de eritromicina (en presencia de AE) necesaria para alcanzar el 50% del efecto antibacteriano máximo, Υ : coeficiente de sigmoïdicidad. Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de concentración inhibitoria mínima (CIM). Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de concentración inhibitoria mínima (CIM). Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.01$). Los valores sin diferencias significativas tienen la letra similar (a, b, c, d, e). (En el análisis estadístico se excluyó a SARM 5-I).

III.6.5.2. Índice E, modelización matemática para cloxacilina y sus combinaciones con AE

En las Figuras 56 a 60 se presentan los gráficos en los que se evalúa el índice E (ΔLog_{10} UFC/mL 24-0 h) vs. el Log_{10} de la concentración de cloxacilina en presencia y ausencia del AE y bajo las diferentes condiciones de pH. Se observa como al acidificar el medio se potencia la actividad antimicrobiana de la cloxacilina frente a *S. aureus* (tanto para la cepa de referencia, SARM y los aislamientos salvajes). Al descender el pH se requieren menores concentraciones de antibiótico para obtener un valor E menor a -3 indicando un efecto bactericida. En los gráficos se destaca como la presencia del AE favorece el accionar de la cloxacilina, ya que se alcanzan valores de E menores con concentraciones más bajas del antibiótico en comparación con los resultados obtenidos con cloxacilina sola.

En el caso de la cepa de referencia ATCC 29213 se logra alcanzar un efecto bactericida muy cercano a la erradicación virtual, dado que los valores de E son cercanos a -4. Esto se observa con concentraciones de 2, 4 y 8 veces la CIM de cloxacilina en la mezcla, a los 3 pHs evaluados (Figura 56).

En los aislamientos salvajes sensibles a cloxacilina (SA13, SA96 y SA139) el comportamiento fue similar al observado para la cepa de referencia (Figuras 57, 58 y 59, respectivamente).

La Figura 60 corresponde a lo que sucede con la cepa resistente a cloxacilina (SARM 5-I). Aquí también se puede observar como la presencia del AE desplaza la curva hacia valores menores de cloxacilina en la mezcla. Es decir que se requieren menores de concentraciones de β -lactámico para alcanzar un mismo efecto bactericida respecto del antibiótico solo. A su vez, el pH ácido también influye positivamente para las mezclas logrando reducir aún más la concentración de cloxacilina requerida para tener un efecto bactericida sobre el *S. aureus*.

La aplicación de la modelización matemática con un modelo sigmoideal para estos datos nos permitió analizar lo que ocurre con el efecto antibacteriano en función del pH para la cloxacilina (Tabla 51) y la presencia de AE (Tabla 52). La

potenciación de la cloxacilina con la acidificación fue evidente al analizar el parámetro C_{50} (concentración necesaria de antimicrobiano para lograr el 50% del efecto antibacteriano máximo). Esta concentración disminuyó a menor pH en forma extremadamente significativa ($p < 0.0001$). En el caso de la adición del AE, la C_{50} de cloxacilina también disminuyó, en forma muy significativa, respecto de la aplicación del antibiótico solo ($p < 0.001$), y hubo un efecto de adición con la acidificación.

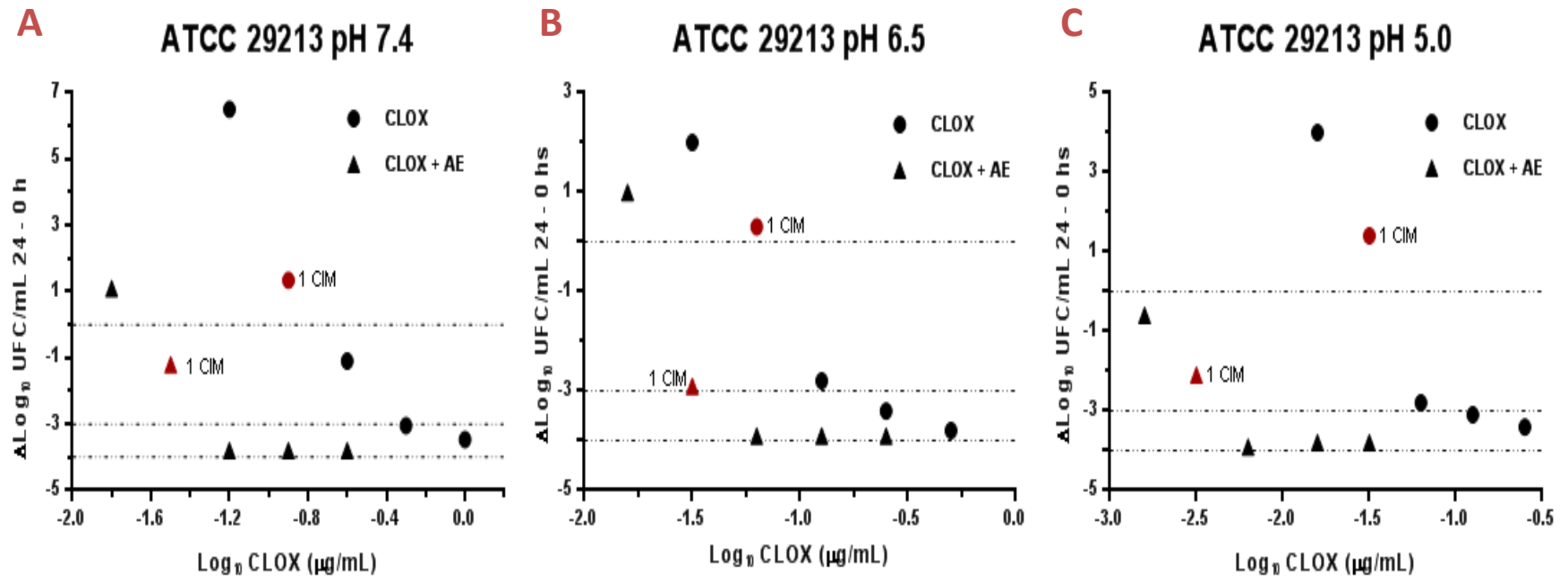


Figura 56. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL 24} - 0 \text{ h}$) de cloxacilina (CLOX) frente a *S. aureus* ATCC 29213 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

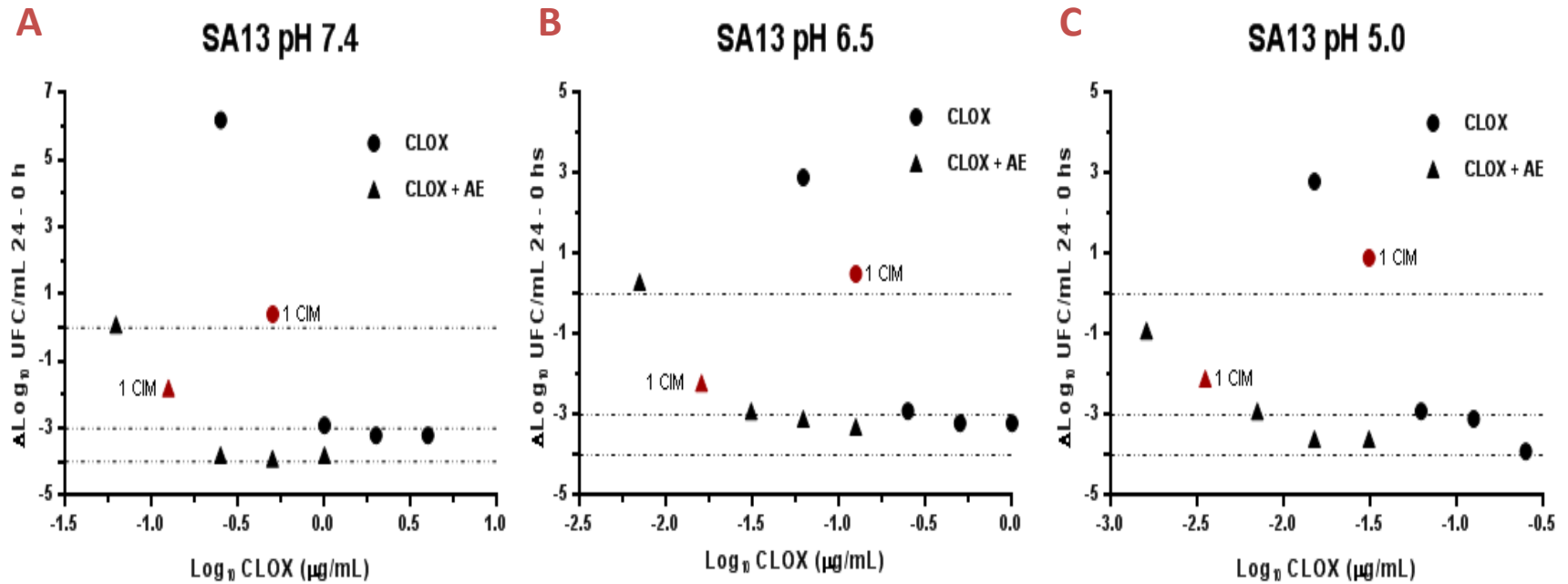


Figura 57. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) de cloxacilina (CLOX) frente a SA13 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

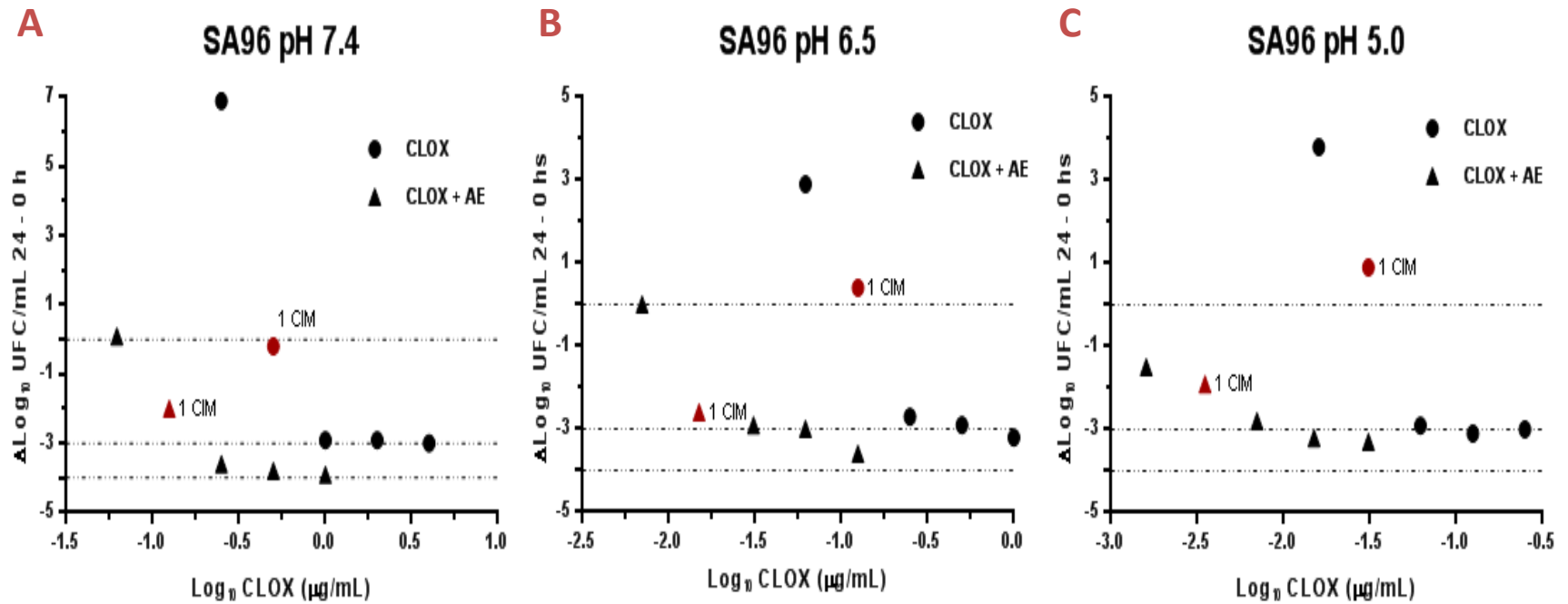


Figura 58. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) de cloxacilina (CLOX) frente a SA96 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

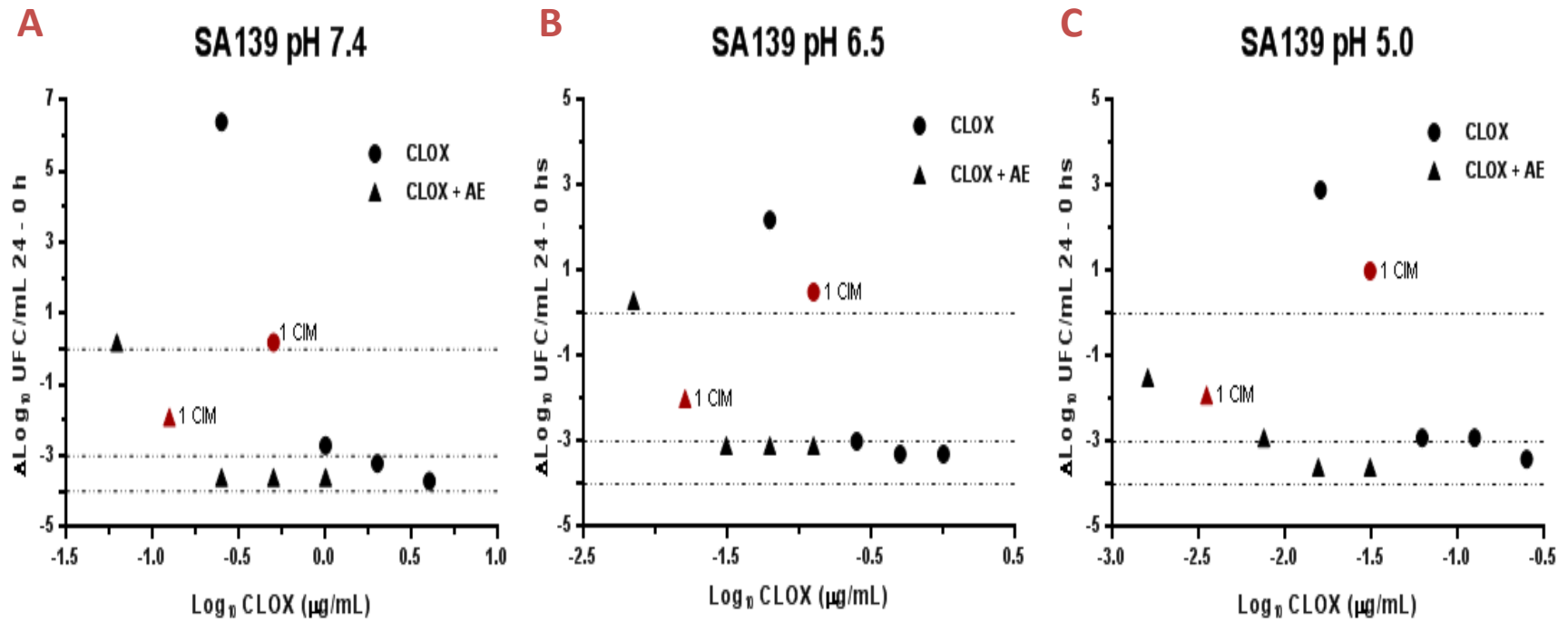


Figura 59. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log}_{10} \text{UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) de cloxacilina (CLOX) frente a SA139 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

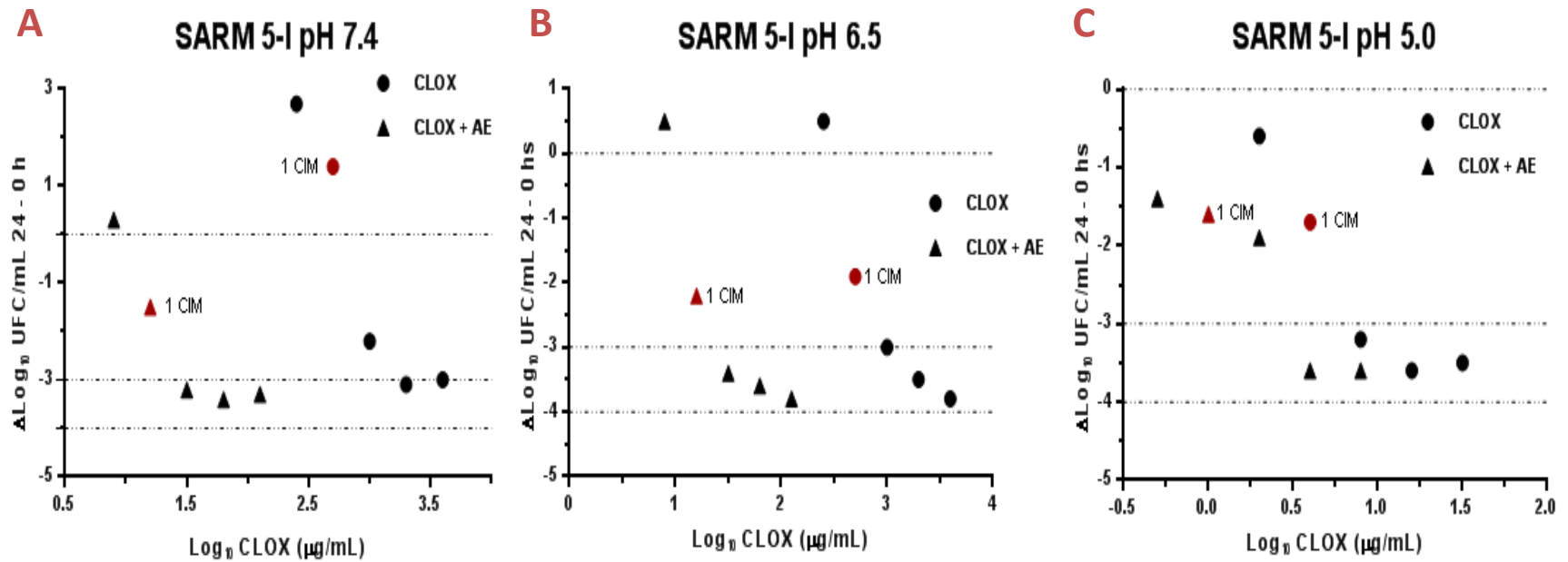


Figura 60. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL 24} - 0 \text{ h}$) de cloxacilina (CLOX) frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Tabla 51. Parámetros estimados por aplicación del modelo sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina.

Cloxacilina	ATCC 29213			Salvajes (13-96-139)			Salvajes (SARM 5-I)		
	Parámetro	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5
R	0.992	0.995	1.000	1.000	0.995	0.994	0.991	1.000	0.997
E_{max} (Log ₁₀ UFC/mL)	10.192	8.943	7.656	10.991	8.477	8.201	8.145	9.022	7.341
Υ	2.788	1.645	4.263	4.769	2.215	2.652	2.028	1.701	1.286
C_{50} (μg/mL)	0.126	0.054	0.034	0.417 ^a	0.105 ^b	0.031 ^c	535.835	240.215	1.724
E_0 (Log ₁₀ UFC/mL)	7.044	4.822	4.376	7.797	5.006	4.672	4.707	5.221	3.480

Modelo sigmoidal. E_0 : Índice E sin cloxacilina, E_{max} : máxima reducción del recuento bacteriano, C_{50} : concentración de cloxacilina necesaria para alcanzar el 50% del efecto antibacteriano máximo, Υ : coeficiente de sigmoidicidad. Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de concentración inhibitoria mínima (CIM). Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Tabla 52. Parámetros estimados por aplicación del modelo sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a cloxacilina en presencia de AE.

Parámetro	ATCC 29213			Salvajes (13-96-139)			Salvajes (SARM 5-I)		
	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0
R	0.996	1.000	0.996	0.999	0.999	0.999	0.998	1.000	0.997
E_{max} (Log ₁₀ UFC/mL)	10.068	8.838	8.565	9.326	8.337	9.027	8.417	8.969	8.705
γ	1.745	3.224	1.451	1.746	2.374	0.752	1.731	2.109	0.571
C_{50} (μg/mL) cloxacilina	0.016	0.016	0.001	0.055 ^a	0.007 ^b	0.001 ^c	7.348	7.380	0.463
E_0 (Log ₁₀ UFC/mL)	5.980	4.886	4.476	5.350	5.095	4.861	4.913	5.214	3.479

Modelo sigmoidal. E_0 : Índice E sin antimicrobianos, E_{max} : máxima reducción del recuento bacteriano, C_{50} : concentración de cloxacilina (en presencia de AE) necesaria para alcanzar el 50% del efecto antibacteriano máximo, γ : coeficiente de sigmoidicidad. Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de concentración inhibitoria mínima (CIM). Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

III.6.5.3. Índice E, modelización matemática para rifaximina y de sus combinaciones con AE

En el caso de la rifaximina, las Figuras 61 a 64 muestran los gráficos del índice E (ΔLog_{10} UFC/mL (24-0 h) vs. el Log_{10} de la concentración de antibiótico en presencia y ausencia del AE y con variación del pH. Tanto para la cepa de referencia (Figura 61) como para los aislamientos salvajes SA13 (Figura 62), SA96 (Figura 63) y SA139 (Figura 64), la actividad inhibitoria (CIM) se mantiene aún al acidificar el medio. La actividad bactericida no se alcanza a pH 7.4 y 6.5 en ninguna de las concentraciones probadas, pero si se logra a pH 5.0 para las concentraciones de 2, 4 y 8 veces la CIM. En cuanto a las combinaciones se puede observar como la curva se desplaza hacia valores menores en la concentración de rifaximina, obteniéndose efecto bactericida cercano a la erradicación virtual para las 3 condiciones de pH.

Con la aplicación del modelo sigmoideal a los datos obtenidos para la rifaximina (Tabla 53) pudimos observar que hay un muy leve aumento de la C_{50} al disminuir el pH, que solo es significativo a pH 5.0 ($p < 0.05$). La presencia de AE (Tabla 54) en el medio al evaluar la acción de la rifaximina permite disminuir, en forma extremadamente significativa, alrededor de 10 veces, la C_{50} de la rifaximina aún al variar el pH ($p < 0.0001$).

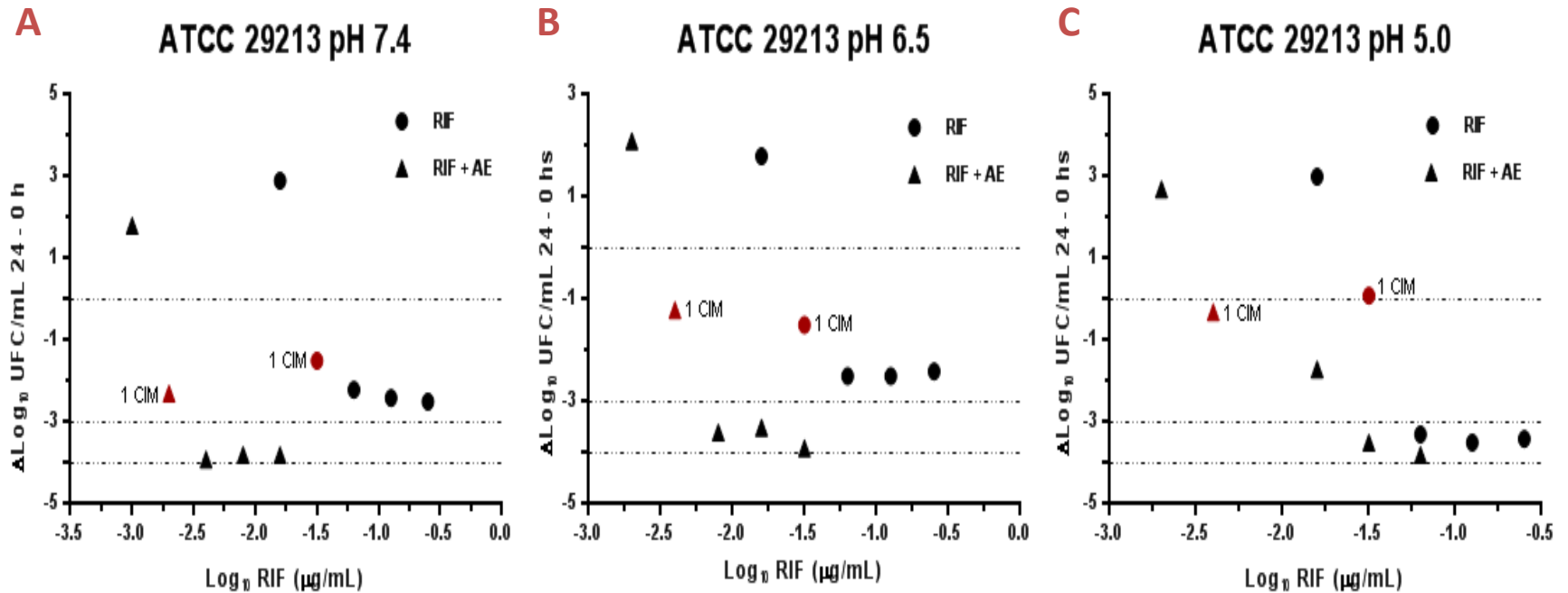


Figura 61. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) de rifaximina (RIF) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

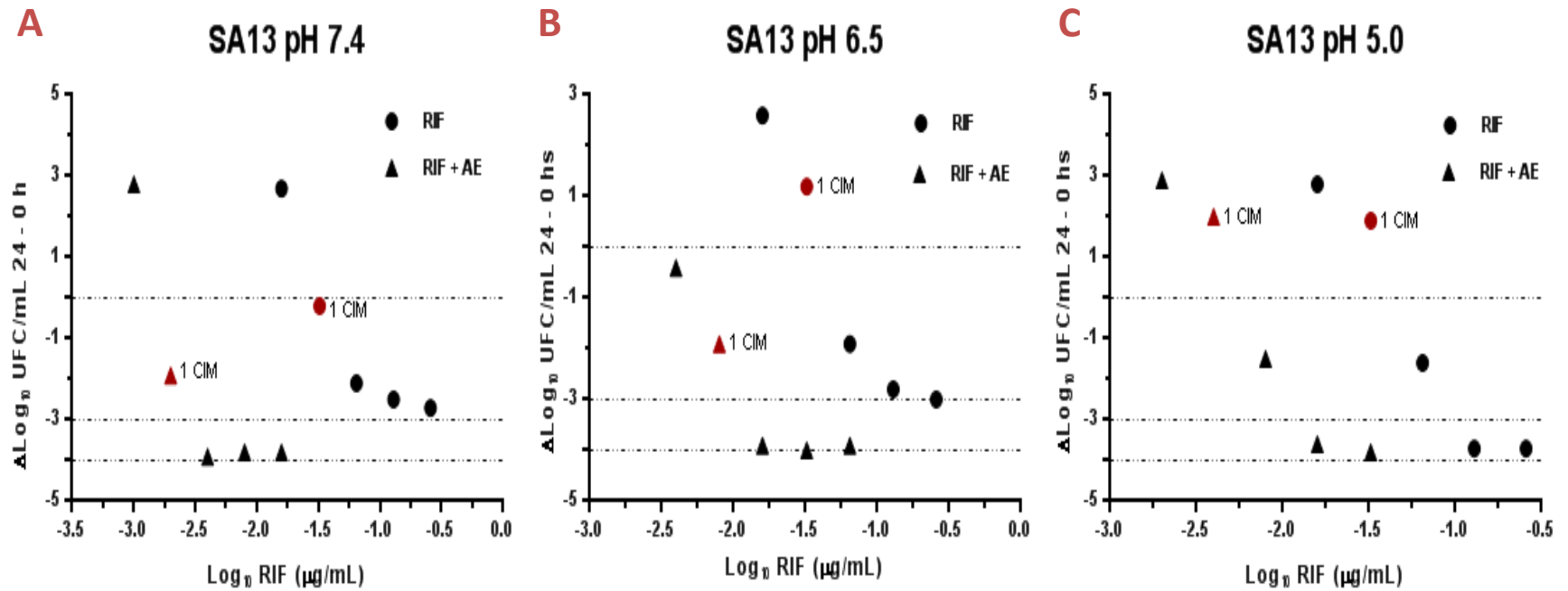


Figura 62. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log}_{10} \text{UFC}/\text{mL } 24 - 0 \text{ h}$) de rifaximina (RIF) frente a SA13 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

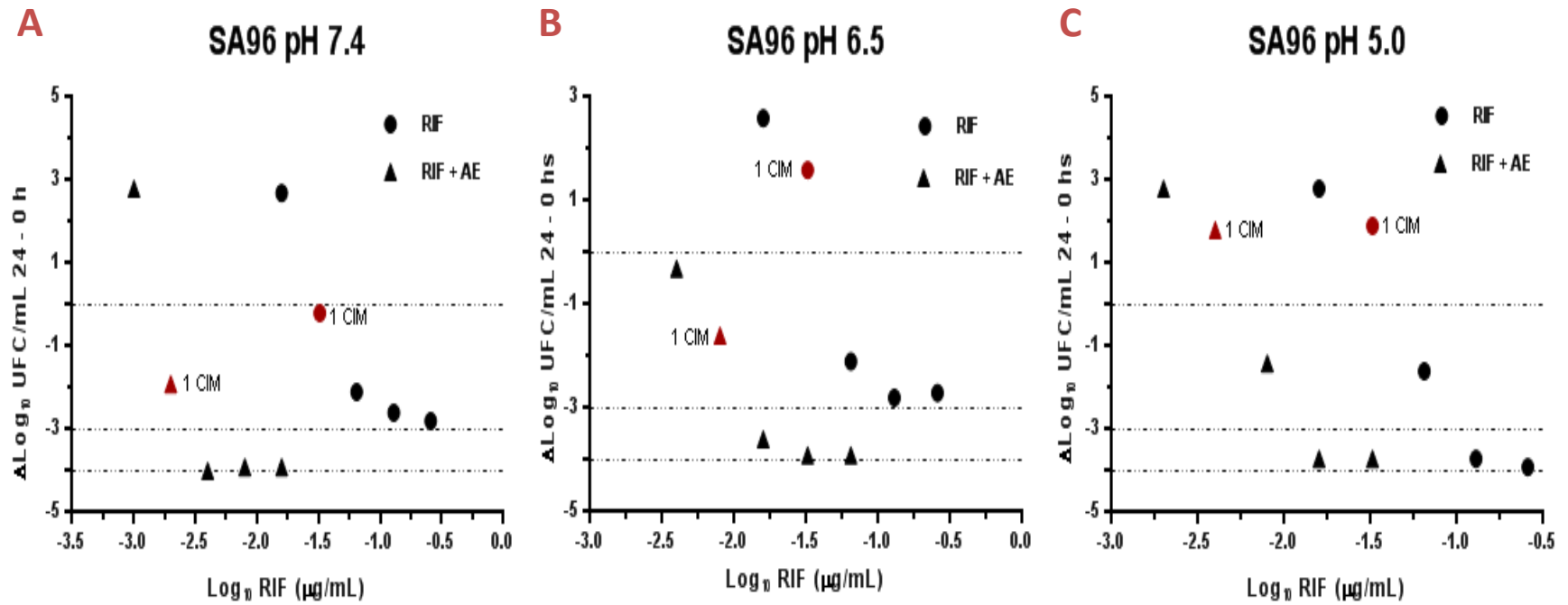


Figura 63. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL 24} - 0 \text{ h}$) de rifaximina (RIF) frente a SA96 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

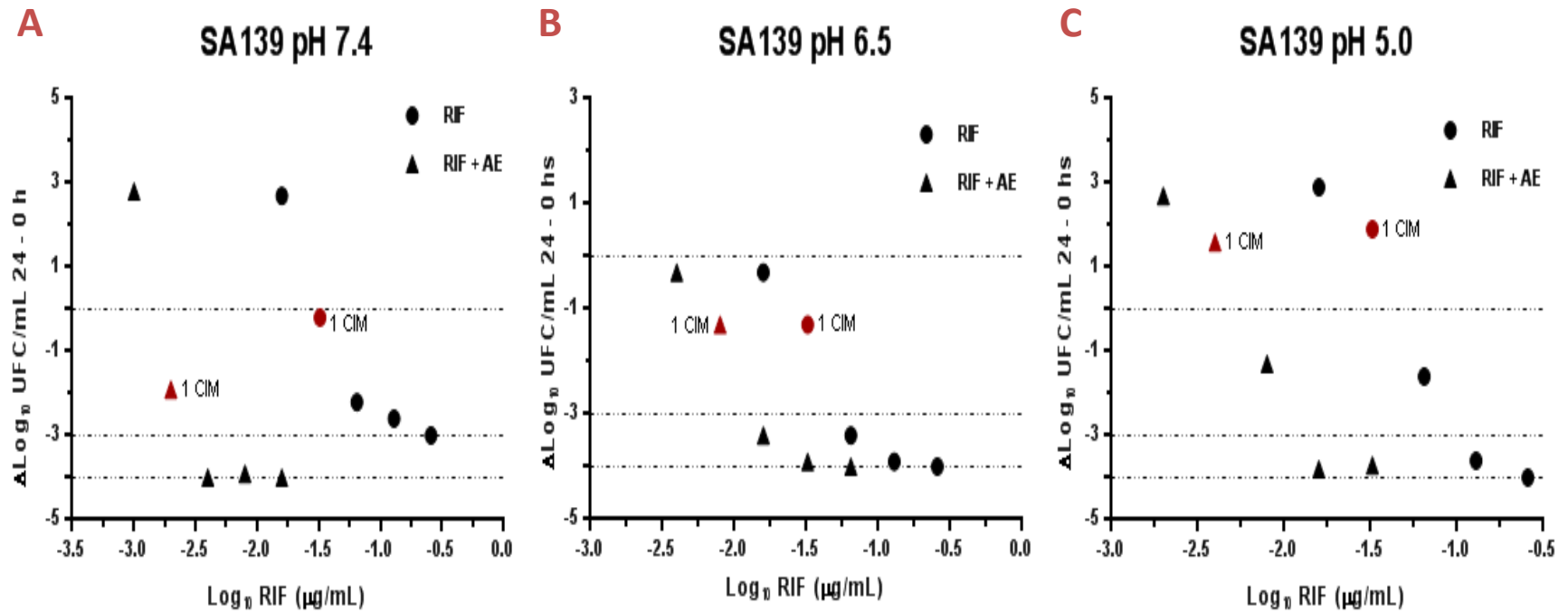


Figura 64. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) de rifaximina (RIF) frente a SA139 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Tabla 53. Parámetros estimados por aplicación del modelo sigmoïdal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina.

Parámetro	Rifaximina			ATCC 29213			Salvajes (13-96-139)		
	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0
R	1.000	1.000	0.998	1.000	0.990	0.995	1.000	0.990	0.995
E_{max} (Log ₁₀ UFC/mL)	8.836	7.398	7.871	8.775	8.078	8.552	8.775	8.078	8.552
γ	3.692	3.212	3.065	2.058	2.345	2.138	2.058	2.345	2.138
C_{50} (µg/mL)	0.020	0.020	0.021	0.021 ^a	0.022 ^a	0.046 ^b	0.021 ^a	0.022 ^a	0.046 ^b
E_0 (Log ₁₀ UFC/mL)	6.428	4.889	4.284	5.914	4.928	4.214	5.914	4.928	4.214

Modelo sigmoïdal. E_0 : Índice E en ausencia de rifaximina, E_{max} : máxima reducción del recuento bacteriano, C_{50} : concentración de rifaximina necesaria para alcanzar el 50% del efecto antibacteriano máximo, γ : coeficiente de sigmoïdidad. Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de concentración inhibitoria mínima (CIM). Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Los valores sin diferencias significativas tienen la letra similar (a, b).

Tabla 54. Parámetros estimados por aplicación del modelo sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a rifaximina en presencia de AE.

Parámetro	ATCC 29213			Salvajes (13-96-139)		
	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0
R	1.000	0.999	0.987	0.999	0.996	0.995
E_{max} (Log ₁₀ UFC/mL)	11.313	8.730	8.653	9.953	9.450	8.487
γ	2.732	2.462	1.131	3.174	1.294	2.027
C_{50} (μ g/mL) rifaximina	0.001	0.003	0.004	0.001 ^a	0.003 ^b	0.006 ^c
E_0 (Log ₁₀ UFC/mL)	7.428	4.868	4.584	5.905	5.092	4.237

Modelo sigmoidal. E_0 : Índice E en ausencia de antimicrobianos, E_{max} : máxima reducción del recuento bacteriano, C_{50} : concentración de rifaximina (en presencia de AE) necesaria para alcanzar el 50% del efecto antibacteriano máximo, γ : coeficiente de sigmoidicidad. Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de concentración inhibitoria mínima (CIM). Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de concentración inhibitoria mínima (CIM). Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.0001$).

III.6.5.4. Índice E, modelización matemática para eritromicina y de sus combinaciones con AE

Al igual que para los antibióticos anteriores, se evaluó el índice E de actividad antibacteriana para eritromicina y sus combinaciones con el AE. Estos resultados se muestran en las Figuras 65 a 71.

Con el análisis de los gráficos se puede observar como al acidificar el medio disminuye la actividad antimicrobiana de la eritromicina frente a *S. aureus* (tanto para la cepa de referencia como para los aislamientos salvajes). En el caso de la eritromicina no se logra actividad bactericida a ninguno de los valores de pH evaluados. Al descender el pH la CIM de este macrólido se incrementa en forma sustancial y significativa ($p < 0.01$).

En ninguno de los casos se alcanza actividad bactericida para la eritromicina sola, independientemente de que sean cepas o aislamientos sensibles (ATCC 29213, SA13, SA96 y SA139) o resistentes (78A, 79A y 86B). En el caso de los aislamientos resistentes, a pH 7.4, se evaluó el índice E del antibiótico en concentraciones de 0.5, 1, 2 y 4 veces la CIM, sin evaluar 8 veces la CIM dado que era demasiado elevada (8192 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A pH 6.5 y 5.0 para estos aislamientos la CIM fue mayor a 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por lo que se tomó como valor de CIM a 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se evaluaron, además de esta, 0.5 y 2 veces esta CIM.

En los gráficos se puede observar como la presencia del AE favorece el accionar de la eritromicina, ya que se alcanzan mejores valores de E con concentraciones más bajas del antibiótico en comparación con los resultados obtenidos para eritromicina sola.

En los aislamientos salvajes sensibles a eritromicina, el comportamiento fue similar al observado para la cepa de referencia.

Las Figuras 69, 70 y 71 corresponden a lo que sucede con los aislamientos resistentes a eritromicina. Aquí también se puede observar como la presencia del AE desplaza la curva hacia concentraciones menores de eritromicina en la mezcla. Es decir que se requieren menores concentraciones del macrólido para alcanzar

un mismo efecto respecto del antibiótico solo. Además, la presencia de AE posibilita la obtención de un efecto bactericida, incluso a pH 6.5 y 5.0.

Los parámetros obtenidos con el análisis de estos resultados mediante el modelo matemático sigmoideal en función del pH se encuentran en la Tabla 55, y los obtenidos por adición del AE se presentan en la Tabla 56. La eritromicina, al igual que se vio anteriormente, disminuyó su potencia al bajar el pH, resultando en una C_{50} mayor para las cepas de referencia y sensibles a este antibiótico (SA13, SA96 y SA139). En el caso de las cepas resistentes SA78A, SA79A y SA86B, no se logró llevar a cabo el modelado a pH 6.5 y 5.0, ya que este arrojaba valores de correlación muy bajos (R cercano a cero).

Cuando se evaluó la adición del AE, se pudo observar que la C_{50} de eritromicina disminuye en todos los casos en forma extremadamente significativa ($p < 0.0001$), evidenciando el sinergismo observado anteriormente independientemente del pH. Además, se puede observar para las cepas de referencia y sensibles a eritromicina, al igual que lo ocurrido con el tablero de damas, que con la acidez la C_{50} aumenta aún en presencia de la esencia, aunque en menor proporción que estando el macrólido solo en el medio.

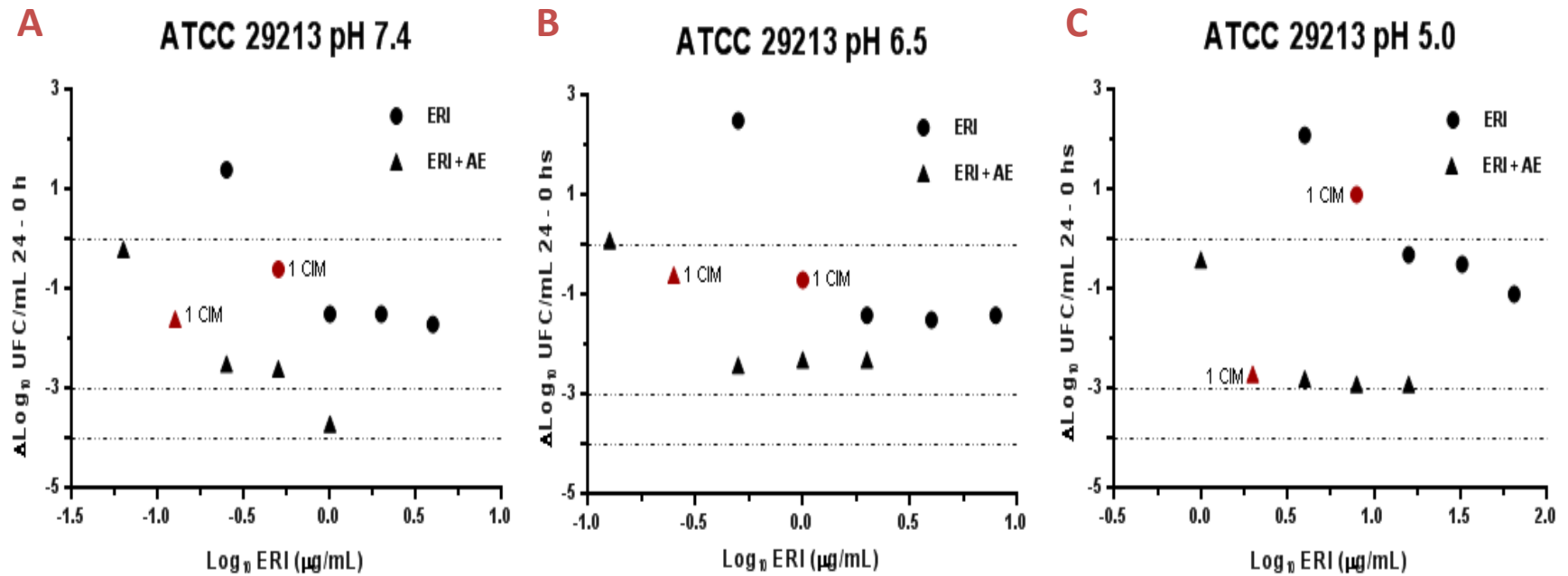


Figura 65. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL 24} - 0 \text{ h}$) de eritromicina (ERI) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

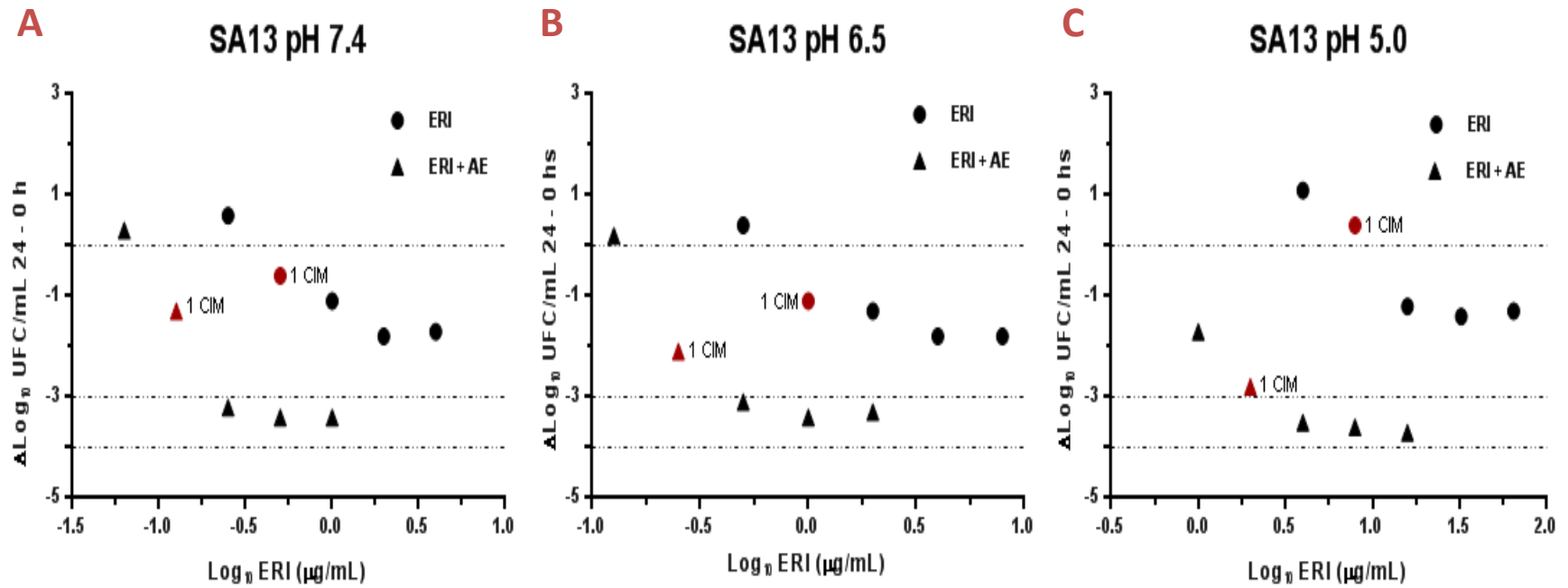


Figura 66. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL 24} - 0 \text{ h}$) de eritromicina (ERI) frente a SA13 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

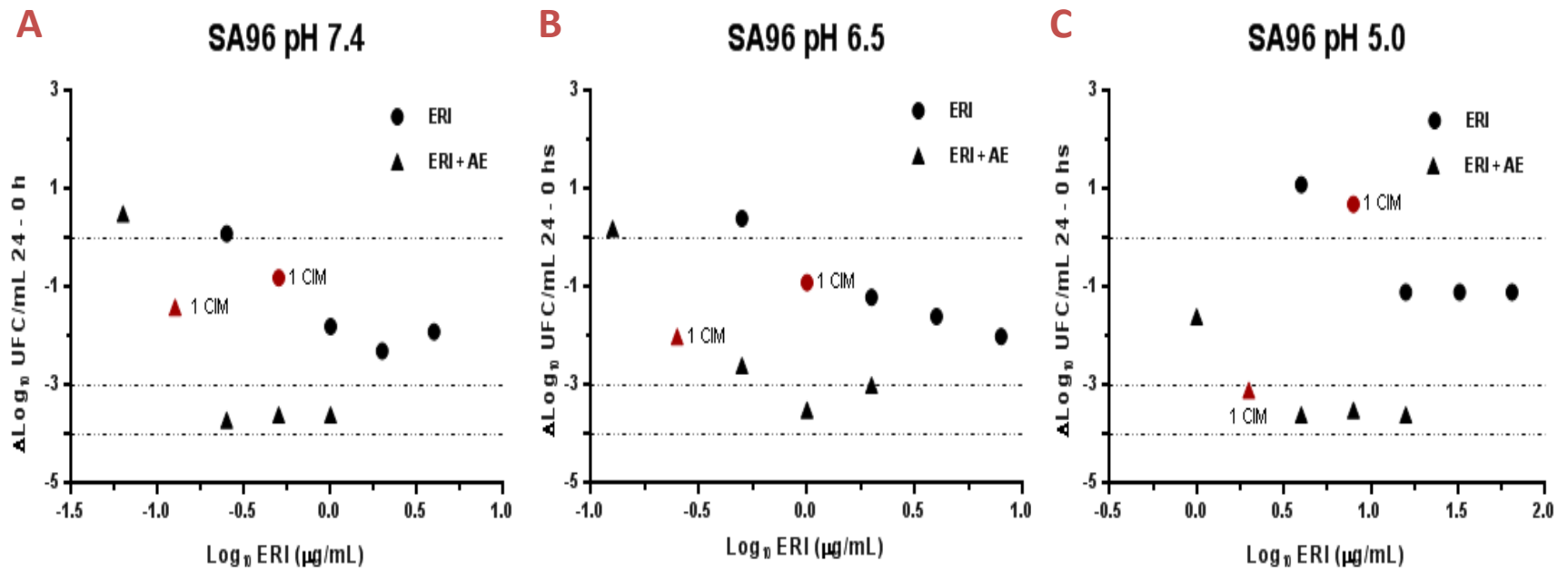


Figura 67. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) de eritromicina (ERI) frente a SA96 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

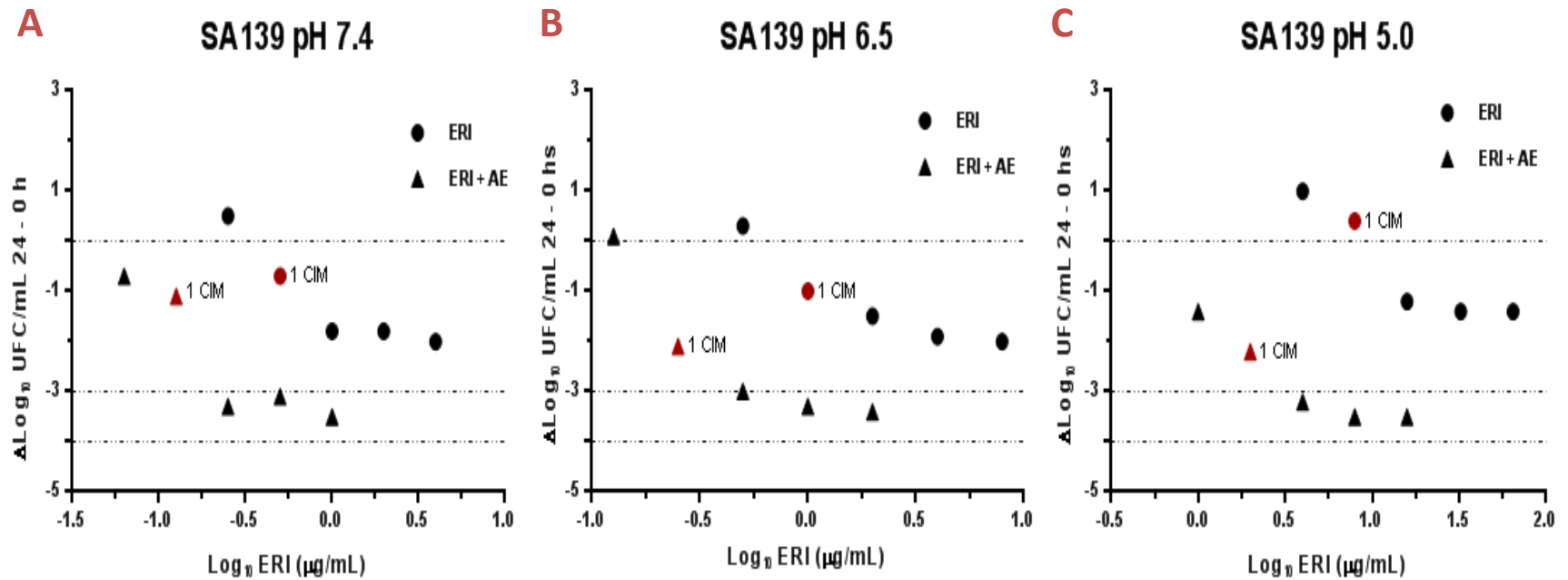


Figura 68. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL 24} - 0 \text{ h}$) de eritromicina (ERI) frente a SA139 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

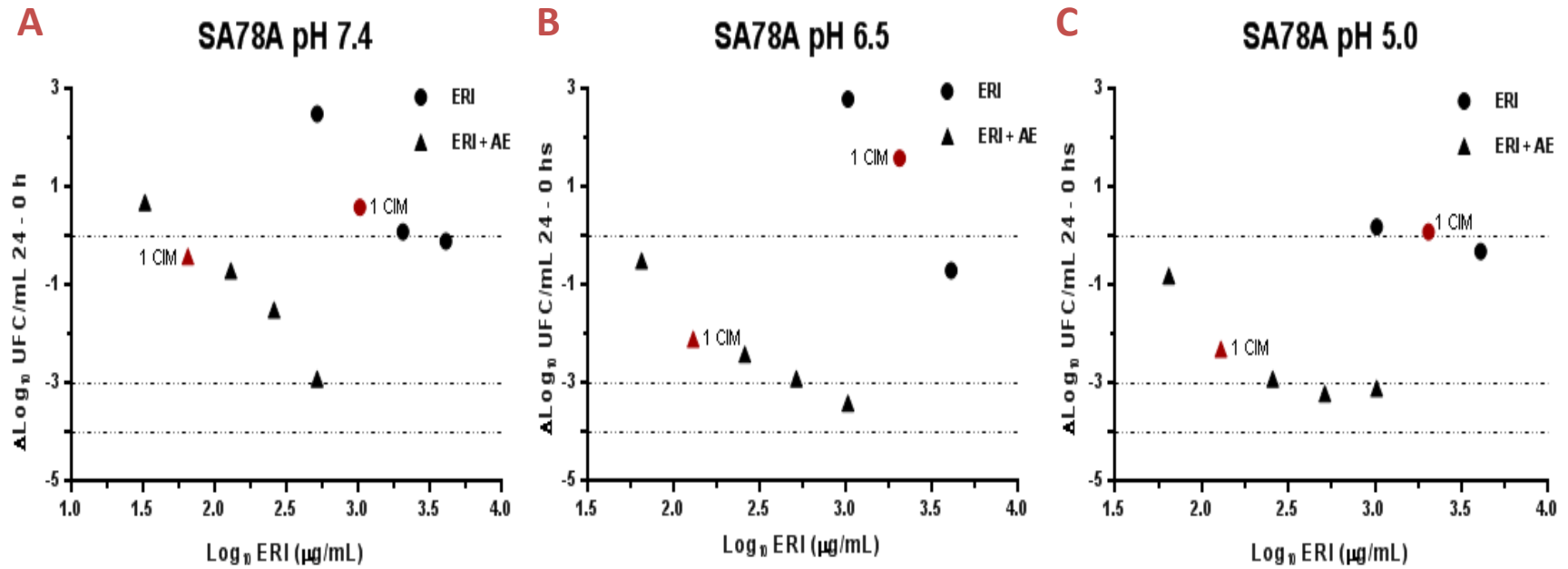


Figura 69. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log}_{10} \text{UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) de eritromicina (ERI) frente a SA78A a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

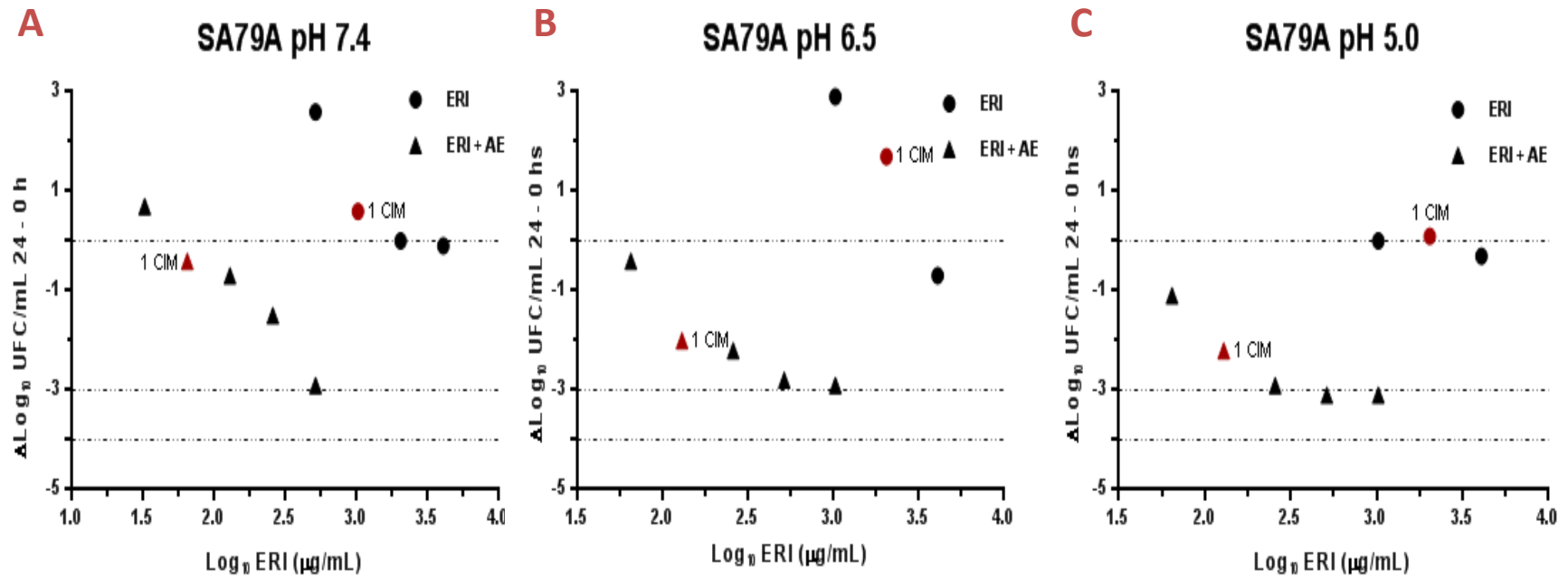


Figura 70. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) de eritromicina (ERI) frente a SA79A a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

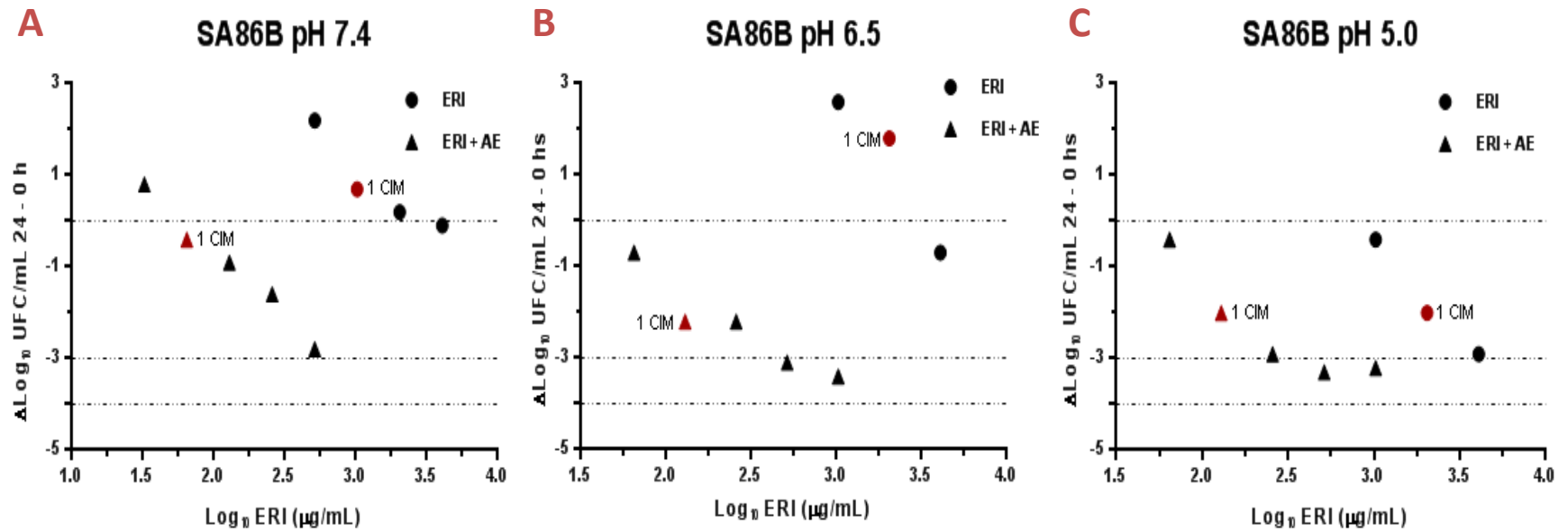


Figura 71. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) de eritromicina (ERI) frente a SA86B a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Tabla 55. Parámetros estimados por aplicación del modelo sigmoidal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina.

Eritromicina	ATCC 29213			Salvajes (13-96-139)			Salvajes (78A-79A-86B)		
	Parámetro	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5
R	1.000	1.000	0.997	0.999	0.999	0.992	1.000	-	-
E_{max} (Log ₁₀ UFC/mL)	7.784	6.475	5.725	9.050	6.538	5.937	4.872	-	-
γ	2.154	3.470	1.250	1.172	1.467	1.277	2.381	-	-
C_{50} (μg/mL)	0.207	0.566	5.159	0.117 ^a	0.322 ^a	3.847 ^b	543.167	-	-
E_0 (Log ₁₀ UFC/mL)	6.109	5.020	4.484	6.873	4.599	4.333	4.671	-	-

Modelo sigmoidal. E_0 : Índice E sin eritromicina, E_{max} : máxima reducción del recuento bacteriano, C_{50} : concentración de eritromicina necesaria para alcanzar el 50% del efecto antibacteriano máximo, γ : coeficiente de sigmoidicidad. Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de concentración inhibitoria mínima (CIM). Para las cepas 78A, 79A y 86B a pH 6.5 y 5.0 no fue posible llevar a cabo la modelización, el modelo arrojó valores de ajuste R cercanos a cero. Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.01$). Los valores sin diferencias significativas tienen la letra similar (a, b).

Tabla 56. Parámetros estimados por aplicación del modelo sigmoïdal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a eritromicina en presencia de AE.

Parámetro	ATCC 29213			Salvajes (13-96-139)			Salvajes (78A-79A-86B)		
	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0
R	0.998	0.988	1.000	0.996	0.999	0.999	0.997	0.998	1.000
E_{max} (Log ₁₀ UFC/mL)	10.692	7.618	7.381	10.797	7.943	8.078	13.846	8.260	5.118
γ	0.639	1.355	3.890	1.273	1.996	1.614	0.399	1.186	1.872
C_{50} (μ g/mL) eritromicina	0.032	0.085	0.841	0.041 ^a	0.112 ^a	0.534 ^b	189.503 ^c	33.592 ^d	61.150 ^e
E_0 (Log ₁₀ UFC/mL)	6.111	5.013	4.484	6.868	4.598	4.344	5.337	4.969	1.892

Modelo sigmoïdal. E_0 : Índice E en ausencia de antimicrobianos, E_{max} : máxima reducción del recuento bacteriano, C_{50} : concentración de eritromicina (en presencia de AE) necesaria para alcanzar el 50% del efecto antibacteriano máximo, γ : coeficiente de sigmoïdicidad. Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de concentración inhibitoria mínima (CIM). Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Los valores sin diferencias significativas tienen la letra similar (a, b, c, d, e).

III.7. Evaluación de la citotoxicidad del AE de *M. armillaris* sobre PMNs

Luego de la extracción de PMNs a partir de sangre bovina, fue posible observarlos mediante la tinción de May-Grundwald Giemsa bajo microscopio óptico con objetivo de inmersión 100X (Figura 72A). Se obtuvo un 95% de viabilidad de las células aisladas realizando el recuento mediante azul tripan en cámara de Neubauer (Figura 72B).

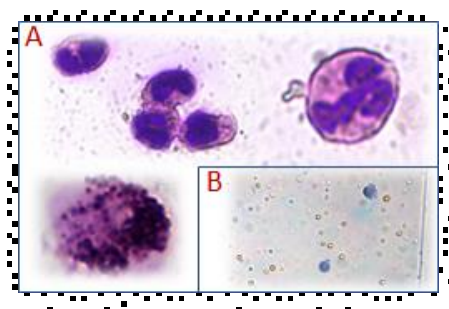


Figura 72. PMNs obtenidos de sangre bovina. A: Tinción de May-Grundwald Giemsa; B: Recuento de células viables en cámara de Neubauer con azul tripan.

Al evaluar la citotoxicidad del AE frente a estas células observamos una importante pérdida de viabilidad a bajas concentraciones (Figura 73). En el rango de 7.5-0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ la mortalidad fue del 100% al contacto con el extracto vegetal. La menor concentración evaluada (0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$) produjo una pérdida de viabilidad del 85% tras dos horas de contacto.

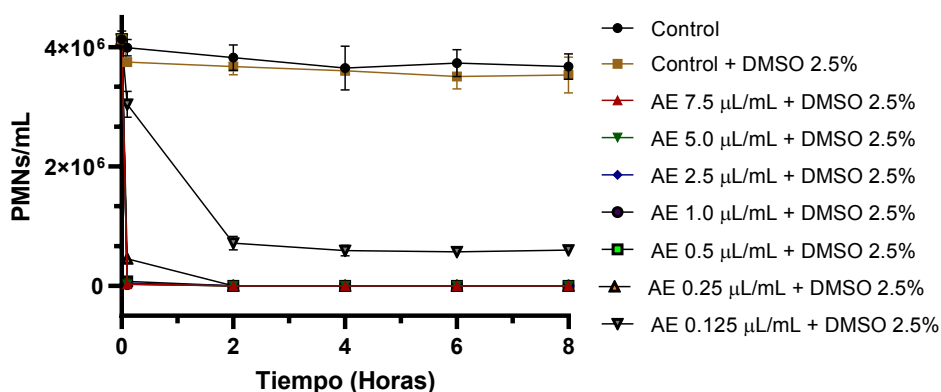


Figura 73. Recuento celular (PMNs/mL) luego de 8 horas de exposición a distintas concentraciones de AE, utilizando un control de DMSO 2.5%.

Este efecto deletéreo del AE de *M. armillaris* sobre los PMNs resultó un inconveniente para la evaluación de la actividad antimicobiana a nivel intracelular. Al ser destruidas las células eucariotas, no se las pudo exponer al *S. aureus* ni a las combinaciones AE/antimicrobianos. Para ello se trabajará posteriormente en el desarrollo de nanoestructuras para la encapsulación del AE a modo de “delivery” de moléculas al medio intracelular. Estrategia que nos permitirá disminuir el efecto citotóxico y favorecerá la llegada de los componentes del extracto al interior celular.

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Obtención y caracterización del AE de *M. armillaris*

La calidad de los AEs está determinada por un complejo grupo de factores agrobiológicos y tecnológicos, como el clima y las condiciones geográficas del cultivo, la duración del almacenamiento y las condiciones de este. Por esta razón es necesario estandarizar las características que el AE debe reunir para garantizar la actividad farmacológica que se le atribuye. El estudio de varias características fisicoquímicas marca la importancia práctica en la aplicación de estos en la vida cotidiana. Propiedades fisicoquímicas como el color, olor, densidad, índice de refracción, rotación óptica, índice de acidez, índice de esterificación, etc., influyen en la calidad de los AEs.

La importancia comercial de los aceites depende principalmente de estas propiedades fisicoquímicas, que proporcionan datos de referencia para determinar su idoneidad para el consumo (Bamgboye y Adejumo, 2010).

El volumen de AE obtenido fue de 550 mL, esta cantidad fue más que suficiente para desarrollar este trabajo de tesis. Al utilizar la misma esencia en todos los ensayos realizados, se logró minimizar las posibles variaciones por extracciones en diferentes épocas del año. Este es un factor importante dado que puede existir variabilidad en la concentración de los componentes de los AEs extraídos de diferentes plantas de una misma especie. El contenido porcentual de cada constituyente puede verse afectado por las condiciones ambientales al ser extraídos bajo diferentes condiciones (Curado y col., 2006). En nuestro caso, la extracción se llevó a cabo en un equipo con producción de vapor *in situ*, donde el material vegetal se encontraba separado del agua en ebullición por una placa cribada. Esta forma de extracción es una de las más utilizadas (Shmidt, 2010).

La determinación de la calidad y la estandarización de un AE es fundamental para favorecer la inclusión de este tipo de extracto vegetal en la industria farmacéutica y avalar las propiedades medicinales del mismo. Dado que la actividad antimicrobiana varía en función de los componentes de la mezcla, es

importante conocer qué variantes logran mantener el efecto antimicrobiano obtenido frente a una determinada especie bacteriana. Respecto al AE de *Melaleuca armillaris* existen escasos estudios reportados sobre su actividad antimicrobiana y solo se ha analizado la composición por cromatografía gaseosa. En nuestro trabajo establecimos parámetros fisicoquímicos que pueden ser tenidos en cuenta para el control de calidad del mismo.

El AE que obtuvimos para trabajar en julio 2015 presentó una consistencia líquida con coloración amarilla pálida y de un olor penetrante y fresco. Al analizar la composición del AE obtenido de las mismas plantas en julio 2017 encontramos un perfil muy similar entre las dos temporadas. El análisis cromatográfico de nuestro AE reveló la presencia de 1.8 cineol como componente principal (72.3%) y en menor magnitud limoneno (7.8%) y α -pineno (6.0%). Estos están comúnmente presentes en AEs con buena actividad antimicrobiana. El 1.8 cineol es un monoterpeno monocíclico con gran acción antimicrobiana. Este compuesto es, en general, el principal componente en la esencia de las especies de *Eucalyptus* (Rodríguez y col., 2006). En varios estudios (Chabir y col., 2011; Farag y col. 2004; Rizk y col., 2012; Silva y col., 2007), también se ha informado al 1.8 cineol como componente principal del AE de *M. armillaris* (33.93% en Egipto; 85.8% en Túnez; 80.2% en Brasil; 33.9% en Egipto; respectivamente). Sin embargo, este resultado no está de acuerdo con otros autores como Amri y col. (2012) y Siddique y col. (2017) quienes informaron una concentración de este marcadamente baja (3.6% y 0.29%, respectivamente). Los otros dos compuestos mayoritarios presentes en el AE con gran actividad antimicrobiana son el limoneno y α -pineno (Dai y col., 2013).

La estandarización de la composición de los AEs es muy importante para el uso farmacéutico. Obtener clones vegetales con sus propias características específicas sería una solución probable a este problema. Esto facilitaría el uso del AE para el establecimiento de cultivos comerciales. De esta forma, se evitaría el problema de la heterogeneidad, lo que daría como resultado la producción de AE con una calidad homogénea entre distintos lotes de producción, lo cual es muy requerido

por los estándares del mercado y así asegurar la actividad farmacológica que se le adjudica. Siani y col. (2002) llevaron a cabo una propagación vegetativa de un quimiotipo de cultivo de *Lippia alba* en seis ubicaciones diferentes en Brasil bajo diversas condiciones ambientales. Después de la extracción del AE en cada región solo observaron ligeras variaciones de contenido y de su perfil cualitativo.

Por otro lado, algunos de los compuestos que forman parte de AEs se encuentran disponibles en el mercado y serían posibles de obtener en caso de que fuera necesario enriquecer el AE obtenido con alguno de ellos. Esto permitirá evaluar la calidad y la eficacia. Sin embargo, es necesario entender qué variación en la composición tiene un efecto en la actividad biológica para establecer un rango de variación posible sin que se vea modificada.

IV.2. Actividad antimicrobiana del AE de *M. armillaris* frente a *S. aureus*

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana del AE se debió agregar al caldo de cultivo Tween 80 dado que la naturaleza lipofílica del extracto dificulta su disolución en el medio de cultivo acuoso. Este surfactante favorece la disolución de la esencia y al utilizarlo al 0.5% no presenta actividad antimicrobiana que interfiera con los resultados obtenidos. Incluso al 1% no produce la inhibición del *S. aureus* (Honorio y col., 2015).

La CIM y CBM son los parámetros más utilizados para cuantificar la actividad antibacteriana de una droga frente a un patógeno infeccioso. Sin embargo, la evaluación temporal de diferentes concentraciones del antimicrobiano frente a un microorganismo permite obtener una mejor descripción acerca de la magnitud del efecto antibacteriano (Craig, 1998). Por ello también es importante analizar que ocurre en el tiempo mediante la construcción de curvas de muerte bacteriana.

Es importante recalcar que la CIM y CBM son parámetros farmacodinámicos estáticos, que nos proveerán solo una limitada información acerca de la actividad de un agente antibacteriano, ya que:

- No aportan información acerca de la velocidad de la actividad antibacteriana (Craig, 1998). La velocidad de muerte bacteriana difiere según

el tipo de mecanismo de acción de los antibióticos, existiendo diferencias notables entre la provocada por agentes bactericidas y bacteriostáticos (Xiong y col., 1996).

- No proveen información acerca de la persistencia de la actividad antibacteriana luego que la exposición del microorganismo al antibiótico ha cesado (efecto postantibiótico) (Craig, 1998).
- Al referirse a una concentración constante de antimicrobiano, solo aportan información farmacodinámica de tipo cualitativa, ya que hace referencia a una respuesta de tipo todo (concentración mayor a CIM o a CBM) o nada (concentración menor a CIM o a CBM) (Craig, 1998).

De manera que estos parámetros farmacodinámicos por sí solos, no reflejan totalmente el contexto *in vivo*, en donde las bacterias no están expuestas a una concentración constante de un antibacteriano, sino que ésta cambia en función del tiempo transcurrido desde su administración, como consecuencia de los procesos de absorción, distribución, eliminación y excreción (Liu y col., 2005). Una de las metodologías empleadas para subsanar este inconveniente, es el estudio de las curvas de muerte bacteriana. En éstas la evolución de una población bacteriana en función del tiempo y en ausencia de antibacteriano son comparadas con las curvas obtenidas en presencia de un antibiótico (Craig, 2002).

La actividad de un antibiótico sobre una población bacteriana también varía en función de factores tales como concentración y tiempo del agente antibacteriano en contacto con la bacteria y variaciones del pH del medio (Mestorino y Errecalde, 2012).

Así mismo, la cinética de muerte bacteriana en condiciones *in vitro* es modificada (aumentada o disminuida) por variaciones del pH, siendo ésta una variable que se debe considerar para simular las condiciones *in vivo*, ya que se establecen gradientes de pH entre el interior celular y el entorno extracelular (desde 5 en los fagolisosomas, 6.5 en el citosol o 7.4 en el exterior), o bien el medio en donde se encuentran las bacterias puede ser modificado a causa de diversas

alteraciones tisulares (tejidos inflamados o presencia de material necrótico) provocadas por el mismo agente infeccioso.

En este sentido, la farmacodinamia ha evolucionado desde una concepción netamente empírica hasta una concepción cuantitativa, permitiendo describir y simular el efecto de un antibiótico sobre una población bacteriana en función del tiempo mediante la modelización matemática de los datos experimentales (Toutain y col., 2002; Toutain y Bousquet, 2004; Toutain y Lees, 2004).

La principal ventaja del estudio farmacodinámico de antibióticos mediante la modelización matemática de las curvas de muerte bacteriana radica en que se pueden analizar y comparar los efectos de diferentes perfiles de concentración del agente seleccionado, al tiempo que proporcionan información más detallada acerca del efecto antibacteriano en función del tiempo (Mueller y col., 2004).

Por lo tanto, la construcción de curvas de muerte bacteriana sería un procedimiento más racional para explicar la interacción fármaco-bacteria *in vivo* que los clásicos parámetros estáticos como la CIM y CBM.

Luego de realizar los ensayos para establecer la CIM, la CBM y evaluar el comportamiento del microorganismo en estudio, mediante curvas de muerte bacteriana frente al AE solo, sin la adición de antibiótico, se ha determinado la existencia de actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, coincidiendo con lo reportado por Amri y col. (2012). Sin embargo, no es posible establecer un paralelismo con dicho trabajo debido a las diferencias en la composición de los AEs, aún siendo de plantas de la misma especie. Las diferencias fundamentales entre ambos son que el extracto obtenido en nuestro estudio presentó valores muy superiores de: 1.8 cineol (72.3% vs 3.6%); limoneno (7.8% vs ausencia); α -pineno (6% vs ausencia); mirceno y β -pineno (2.2% vs ausencia); terpinen-4-ol (1.4% vs 0.4%) y α -terpineol (1.4% vs 7.7%).

La CIM del AE de *M. armillaris* necesaria para inhibir *S. aureus* ATCC 29213 fue de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a pH 7.4 y 6.5, mientras que a pH 5.0 disminuyó 2 veces. Frente a todas las cepas y aislamientos salvajes ensayados, la CIM fue de 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a pH 7.4, manteniéndose a pH 6.5 para la cepa SARM 5-I y los aislamientos salvajes

SA13, SA96, SA139, y disminuyendo a la mitad para los 3 aislamientos restantes a pH 6.5 (SA78A, SA79A y SA86B). Estas variaciones son debidas a la existencia de subpoblaciones bacterianas con diferentes sensibilidades. Al analizar lo sucedido a pH 5.0 se observó un descenso a la mitad de la CIM obtenida a pH 6.5 (6.25 y 3.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente). Algo similar ocurrió con la CBM, ya que este parámetro disminuyó entre 2 y 4 veces según la cepa o aislamiento comparando con lo que sucede a pH 7.4 y 5.0. En el caso de la CIM, este parámetro fue significativamente menor a pH 5.0 respecto de 7.4 y 6.5 ($p < 0.001$). La CBM también disminuyó significativamente con la acidez ($p < 0.001$).

Falci y col. (2015) estudiaron la composición y la actividad antimicrobiana del AE de una especie de *Melaleuca* (no especificada) cultivada en Brasil, en la localidad de Pouso Alegre, al sur del estado de Minas Gerais. Este AE presentó 70.8% de 1.8 cineol, 8.95% de terpineol y 8.25% limoneno. La cantidad de 1.8 cineol, limoneno y mirceno (1.99%) fue similar al AE de *M. armillaris* que se obtuvo en este trabajo de tesis. Si bien no se especifica la especie de *Melaleuca*, se puede hacer un paralelismo con la composición de los AEs mencionados. Estos autores demostraron una importante actividad antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* con valores de CIM entre 1 y 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$, y CBM entre 2 y 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$, valores inferiores a los obtenidos en el presente estudio, que pueden atribuirse a una mayor sensibilidad de las cepas de *S. aureus* utilizadas por los autores, y/o incidencia en la actividad antimicrobiana del resto de los componentes minoritarios. Sin embargo, Li y col. (2014) encontraron que la CIM del 1.8 cineol frente a *S. aureus* ATCC 25923 fue de 6.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

El alto contenido de 1.8 cineol puede ser uno de los factores que contribuyen a la actividad antibacteriana del AE, al cual se le ha atribuido como mecanismo de acción la facilitación de la permeabilidad de las membranas de microorganismos como *S. aureus* debido a su gran hidrofobicidad (Carson y col., 2006; Oliveira y col., 2015). Este compuesto suele ser el más abundante en el AE de *Eucalyptus globulus*. Yáñez Rueda y Cuadro Mogollón (2012) encontraron una importante actividad para esta especie frente *S. aureus* ATCC 29213 (CIM de 12.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en

la cual la composición del mismo fue similar a la de *M. armillaris* evaluada en esta tesis: 1.8 Cineol (82.27%), seguido de Limoneno (3.70%), α -Pino (3.16%), Terpinen-4-ol (1.4%), α -Terpineol (1.2%), β -Mirceno (1.12%) y α -Terpineno (1.1%), entre otros. Esto podría indicar un sinergismo entre estos componentes particularmente efectivo frente a cepas de *S. aureus*.

La relación existente entre CIM y CBM permite realizar el análisis acerca de si un antimicrobiano puede tener una actividad bactericida o bacteriostática. Un compuesto es bacteriostático si la relación CBM/CIM es mayor a 4 (Pankey y Sabath, 2004). La capacidad de un AE de actuar como bactericida o bacteriostático dependerá del quimiotipo del mismo, es decir de los compuestos que conformen el extracto (Mayaud y col., 2008). Al analizar la CIM y CBM del AE de *M. armillaris* encontramos que para los aislamientos salvajes SA13, SA96 y SA139 estos parámetros coinciden, y esta coincidencia se mantiene con los diferentes valores de pH. En cuanto a las demás cepas, la relación CBM/CIM fue entre 2 y 4, manteniendo la relación al acidificar el medio de cultivo. Por lo tanto, se puede decir que el AE de *M. armillaris* presenta una actividad bactericida frente al *S. aureus*, la cual es independiente del pH del medio.

Cuando se evaluaron las curvas de muerte bacteriana del AE frente a las cepas de referencia, SARM y aislamientos salvajes de *S. aureus* (figuras 15 a 22), se observó una disminución del recuento bacteriano en función del tiempo de exposición al mismo. Este tipo de ensayo ha sido utilizado generalmente para determinar la cinética de muerte bacteriana *in vitro*. Sin embargo, también puede ser muy útil para distinguir si la muerte bacteriana es dependiente de la concentración del antimicrobiano y/o si es dependiente del tiempo de contacto. La muerte bacteriana concentración dependiente se produce cuando la velocidad y el grado de muerte son mayores en presencia de concentraciones crecientes de antimicrobiano, como ocurre con aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Por otro lado, para aquellos que son tiempo dependiente, la muerte bacteriana ocurre cuando el contacto es más prolongado y el incremento de las concentraciones

varias veces por encima de la CIM no producen un mayor grado de muerte en forma proporcional, como ocurre con los β -lactámicos (Pankey y Sabath, 2004).

En las curvas de muerte bacteriana obtenidas con el AE de *M. armillaris* frente a las cepas de referencia, SARM y los aislamientos salvajes de *S. aureus*, en general se observó una ligera caída de la pendiente de la curva cuando se evaluó una concentración equivalente a la CIM del AE para cada microorganismo. A su vez, para concentraciones de 0.5 CIM no existió un grado de crecimiento relevante, y en muchos casos se observó disminución del inóculo inicial. Para concentraciones de 2, 4 y 8 veces la CIM se evidenció una caída del conteo de células bacterianas rápidamente a las 2 horas, continuando el descenso en forma exponencial hasta las 8-12 h, para luego mantener el conteo bacteriano hasta las 24 h post iniciado el ensayo. Este patrón se mantuvo en general para todas las cepas y aislamientos salvajes, e incluso al modificar el pH del medio.

En el caso de la cepa de referencia (ATCC 29213) a pH 7.4 se logró alcanzar un descenso de 2.6 Log_{10} UFC/mL del inóculo inicial para concentraciones de 2, 4 y 8 veces la CIM. A pH 6.5 el descenso para estas concentraciones fue de 2.8 Log_{10} UFC/mL. A pH 5.0 el descenso del inóculo fue de 2.8 para 2 CIM, 3.6 para 4 CIM y 3.9 para 8 CIM. Con estos resultados se puede ver que, a mayor concentración y acidez, la actividad antibacteriana del AE es más elevada, siendo similar entre concentraciones de 4 y 8 CIM.

En el caso de los aislamientos salvajes SA13, SA96 y SA139 la disminución del inóculo inicial para 2 CIM a las 24 horas fue de 2.7-3.0 Log_{10} UFC/mL a pH 7.4, de 3.0-3.2 a pH 6.5 y 2.9-3.2 a pH 5.0. En cuanto a 4 y 8 CIM, el descenso fue de 2.5-3.5 Log_{10} UFC/mL a pH 7.4, de 3.1-3.7 a pH 6.5 y 3.2-3.9 a pH 5.0. En lo que se refiere a los aislamientos salvajes SA78A, SA79A y SA86B se observó una caída de 3.1-3.8 para los 3 valores de pH a concentraciones de 4 y 8 CIM. En el caso de la concentración de 2 CIM para estas cepas la caída del inóculo fue entre 2.5 y 3.4 Log_{10} UFC/mL. Por último, para la cepa SARM 5-I la situación fue similar, concentraciones de 4 y 8 veces la CIM produjeron una caída en las UFC/mL entre 3.2 y 3.6 unidades logarítmicas a los 3 valores de pH. De estos resultados se

destaca la actividad antimicrobiana del AE de *M. armillaris*, logrando disminuir el inóculo inicial aún con variación del pH.

El modelado matemático de la respuesta de un microorganismo a una determinada condición o presencia de un compuesto inhibidor es muy útil para comprender el comportamiento de este frente a estas situaciones y poder predecir la efectividad de un tratamiento en condiciones controladas. Para asegurar la validación del modelo aplicado, es importante que el modelo tenga un buen ajuste a los datos experimentales, en términos de R, que debe oscilar entre 0 y 1, el ajuste es mejor si estos parámetros se acercan a 1 (Jasiwal y Jaiswal, 2014).

La aplicación del modelo de Gompertz a los datos obtenidos en las curvas de crecimiento bacteriano nos permitió obtener parámetros como la velocidad de crecimiento (μ), la duración del período de latencia (LPD) y la densidad máxima de población (MPD). Usamos este modelo en los casos en los que existió crecimiento bacteriano, aplicándose para las curvas control (sin AE) y 0.5 CIM a pH 7.4. La presencia del AE, incluso en concentraciones sub-CIM, disminuyó la μ , extendió la LPD y redujo la MPD. Algo similar encontraron Hayouni y col. (2008) cuando evaluaron AE de *M. armillaris* frente a bacterias ácido-lácticas. Estos parámetros también cambian de la misma forma por la disminución del pH, aunque en menor medida, destacando la menor capacidad de crecimiento de *S. aureus* en condiciones ácidas. Weinrick y col. (2004) han encontrado que *S. aureus* en condiciones ácidas modifica su expresión génica para promover mecanismos de defensa contra ese medio, lo que puede conducir a una menor tasa de crecimiento.

A pH 6.5 y 5.0, solo el control aumentó el recuento bacteriano, por lo que no se aplicó el modelo de Gompertz para 0.5 CIM. En este caso y para las curvas de muerte bacteriana obtenidas a 1, 2, 4 y 8 veces la CIM se aplicó el modelo sigmoideo menos base. Con este modelo obtuvimos el T_{150} (tiempo en el que se alcanzó el 50% de la caída máxima en el recuento bacteriano, N_{max}). Este parámetro disminuyó a medida que aumentaba la concentración de AE, lo cual se repitió con los 3 pHs; es decir que el tiempo necesario para lograr la caída del

recuento bacteriano fue menor. Por otro lado, N_{max} estuvo más próximo a N_0 con mayores concentraciones de AE, lo que indica que hay un efecto antibacteriano mucho mayor ya que es posible eliminar todo el inóculo inicial. Coincidiendo con nuestros hallazgos, Navarro-Cruz y col. (2018) encontraron que al modelar el efecto antibacteriano del AE de *Lippia berlandieri* contra *S. aureus*, el tiempo necesario para disminuir el inóculo inicial en un 50% fue más corto al modificar el pH de 7 a 5.

El AE mejora su actividad antimicrobiana a un pH más bajo, se requieren concentraciones más bajas para lograr el mismo efecto. Este comportamiento es similar tanto para las cepas de referencia como para las de tipo salvaje. Modelando los datos del índice de actividad antibacteriana mediante un modelo sigmoideal obtuvimos parámetros valiosos como la concentración necesaria para alcanzar el 50% del efecto máximo (C_{50}). El valor de este parámetro fue menor a pH más bajo para todas las cepas evaluadas. Otro parámetro importante es E_{max} , que disminuyó a pH ácido, pero debemos considerar que E_0 también es menor, esto se debe a que *S. aureus* es ligeramente susceptible a pH ácido. El efecto antibacteriano máximo E_{max} es menor a pH más bajo, lo que puede estar influenciado por una menor capacidad de crecimiento bacteriano. A altas concentraciones, el efecto antibacteriano fue similar (y cercano a la virtual erradicación) para los 3 pHs, mientras que a pH ácido E_0 fue menor, lo que tuvo incidencia en el valor de E_{max} .

El mecanismo de acción del AE de *M. armillaris* aún no ha sido investigado frente a *S. aureus*. Hayouni y col. (2008) estudiaron la actividad antimicrobiana de esta especie frente a diferentes especies de *Lactobacillus*. Dado que 1.8 cineol fue el componente principal encontrado (68.92%), estos autores sugieren a modo de hipótesis que este compuesto podría haber desestabilizado la membrana citoplásmica de dichas bacterias, tal como lo han demostrado Li y col. (2014). Sin embargo, el modo de acción postulado de *M. armillaris* por Hayouni y col. (2008) involucra también a los componentes minoritarios hallados (α -Pineno Terpinen-4-ol, sabineno, β -Mirceno y α -Terpineno, entre otros). Según este autor, dichas

moléculas interactúan con la membrana celular, donde se disuelven en la bicapa fosfolipídica, alineándose entre las cadenas de ácidos grasos. Esta distorsión de la estructura física causaría expansión y desestabilización de la membrana, aumentando la fluidez de la membrana, lo que a su vez aumentaría la permeabilidad pasiva.

IV.3. Actividad antimicrobiana de cloxacilina y de su combinación con AE de *M. armillaris* frente a *S. aureus*

IV.3.1. Cloxacilina

La cloxacilina es un antimicrobiano semisintético derivado de la penicilina (Figura 74), que resiste la ruptura provocada por la enzima penicilinasas. Es un antibiótico con actividad bactericida ampliamente utilizado en medicina veterinaria frente a *S. aureus* productor de β -lactamasa (Mestorino y Errecalde, 2012). Al evaluar la sensibilidad de las cepas de referencia, SARM y los aislamientos salvajes a cloxacilina, utilizamos como marcadores discos de oxacilina y cefoxitina. El primero representa a todas las penicilinas estables a penicilinasas y el segundo representa el marcador sustituto de oxacilina (CLSI 2013, documento M100-S23).

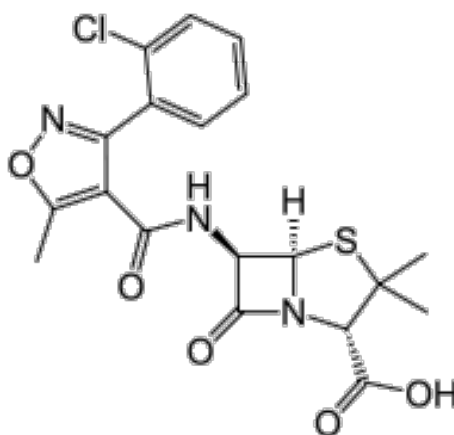


Figura 74. Estructura molecular de la cloxacilina.

La CIM de cloxacilina se comparó con el valor obtenido para oxacilina (penicilina antiestafilocócica) frente a la cepa de referencia (*S. aureus* ATCC 29213) aplicando el rango de concentraciones (0.12-0.5 µg/mL) indicado por la CLSI en su documento VET01-S2 (2013). La CIM de cloxacilina obtenida para *S. aureus* ATCC 29213 fue de 0.125 µg/mL y la CBM de 0.5 µg/mL a pH 7.4. Croes y col. (2010) obtuvieron para la misma cepa frente a oxacilina una CIM de 0.25 µg/mL con una CBM de 0.5 µg/mL.

Los 3 aislamientos salvajes sensibles (SA13, SA96 y SA139) presentaron una CIM de 0.5 µg/mL a pH 7.4. En todos los casos, se observó una disminución muy significativa de esta concentración al acidificar el medio de cultivo ($p < 0.001$). Lo mismo ocurrió con la cepa SARM 5-I, donde a pH 7.4 y 6.5 la CIM fue de 512 µg/mL mientras que disminuyó a 4 µg/mL a pH 5.0. Se ha comprobado que los β-lactámicos mantienen la actividad a un pH de 5.0 (Barcia-Macay y col., 2006). Este hallazgo también fue demostrado en el presente estudio, donde no solo se vio que la potencia del antibiótico se mantiene, sino que se incrementa. Además, la cepa SARM recuperó parcialmente la sensibilidad a cloxacilina a pH 5.0, al igual que lo observado por Lemaire y col. (2007) empleando un medio con pH 5.5. El medio ácido podría generar un cambio en la estructura tridimensional de la proteína PBP2a afectando su centro catalítico de modo que aumentaría la accesibilidad del antibiótico al sitio activo. Este sitio activo, en condiciones de pH cercano a 7, se mantendría cerrado e inaccesible para el antimicrobiano. Como consecuencia, a pH bajo se logra recuperar parcialmente la sensibilidad al mismo, siendo un efecto que depende del β-lactámico, de la concentración y del tiempo de exposición (Lemaire y col., 2008).

Al evaluar la CBM de la cloxacilina se observó que esta concentración fue entre 2 y 4 veces la CIM, lo que indica un efecto bactericida del β-lactámico. Se considera que un antibiótico es bacteriostático si la CBM/CIM es mayor a 4 (Pankey y Sabath, 2004). Nuevamente se pudo evidenciar, al igual que para la CIM, como la acidez del medio incrementó la actividad antimicrobiana del mismo en forma extremadamente significativa ($p < 0.0001$). Incluso se logró mantener la relación

CBM/CIM entre 2 y 4, al igual que para la cepa SARM 5-I. La actividad antibacteriana de cloxacilina a los 3 pHs evaluados, presentó un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones, revelando claramente que su actividad frente a *S. aureus* no se vió aumentada al incrementar las concentraciones de cloxacilina. Es decir, la cloxacilina es un antibiótico con acción bactericida dependiente del tiempo de contacto (Craig, 1998). Con el análisis del patrón de las curvas de muerte obtenidas, se puede observar como concentraciones de 4 y 8 veces la CIM disminuyen el inóculo bacteriano a una velocidad similar. La mayor caída en el recuento de microorganismos se produce entre las 4 y 12 horas para los aislamientos sensibles al antibiótico, independientemente del pH, a concentraciones de 2, 4 y 8 CIM. En cambio, en el caso de la cepa SARM 5-I la caída es mucho más lenta, registrándose entre las 4 y 24 horas en las mismas condiciones. El grado de muerte en este patrón de actividad bactericida depende en gran medida del tiempo de exposición. La ausencia de mayores niveles de muerte bacteriana a mayores concentraciones es una característica común de los antibióticos β -lactámicos (Craig, 1998).

En las curvas de muerte bacteriana en las que se enfrentan a las cepas de *S. aureus* con la cloxacilina se puede observar que independientemente de la concentración del antibiótico, la caída en el recuento bacteriano comienza a evidenciarse alrededor de las 4 h. Este comportamiento es típico de los antibióticos denominados *Tiempo dependientes*. En este grupo de antibióticos es importante mantener la concentración por encima de la CIM durante un 40-50% de tiempo entre intervalo de dosis para lograr una eficacia superior al 85% (Errecalde, 2004).

Con la modelización de las curvas de muerte bacteriana utilizando el modelo sigmoidal encontramos que el tiempo necesario para alcanzar el 50% (T_{150}) de la caída máxima del recuento bacteriano (N_{max}) a pH 7.4 fue de 5.61 h para las cepas salvajes en contacto con 2 CIM de cloxacilina, bajando a 3.50 h con 4 CIM y 3.30 h con 8 CIM. Para la cepa de referencia estos valores fueron similares entre sí, 5.66 h para 2 CIM, y 5.51 h para 4 y 8 CIM. Al disminuir el pH a 6.5 y 5.0, el valor de T_{150}

fue menor para las tres concentraciones evaluadas. En cuanto al N_{max} , se observó que concentraciones de 4 y 8 CIM logran un N_{max} similar a N_0 , indicando que prácticamente la totalidad del inóculo es eliminado. Con concentraciones de 2 CIM el N_{max} no alcanza el valor de N_0 , sobreviviendo una parte del inóculo a las 24 h, sin embargo, al disminuir el pH esta diferencia disminuye.

Por otro lado, con el análisis mediante el modelo de Gompertz de las curvas donde existió crecimiento de la población bacteriana (en ausencia de cloxacilina y con concentraciones equivalentes a 0.5 y 1 CIM) se puede observar que la velocidad de crecimiento (μ) disminuye por acción del antimicrobiano, y es aún menor al acidificar el medio. A su vez, hay un aumento en el período de latencia (LPD) y una disminución en la densidad máxima de población (MPD).

IV.3.2. Combinación AE/Cloxacilina

La situación alarmante de la resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos ha incentivado la búsqueda de alternativas, y particularmente la idea de encontrar sinergismo entre estos fármacos y extractos vegetales. La existencia de sinergismo resulta en un aumento de la tasa de muerte, una potenciación del antibiótico, disminución en la capacidad de seleccionar cepas resistentes, etc. La comprensión del mecanismo de sinergia puede proporcionar una nueva estrategia para el tratamiento de enfermedades infecciosas al reducir los efectos secundarios producidos por las altas dosis de antibióticos (Bhardwaj y col., 2016).

Entre las posibles ventajas que pueden presentar las interacciones sinérgicas de compuestos se pueden incluir el incremento de la eficacia terapéutica, la reducción del riesgo de toxicidad por disminución de la dosis inicial manteniendo la eficacia, la disminución del riesgo de selección de resistencia bacteriana y la provisión de sinergismo selectivo sobre el huésped (Chou, 2006).

El sinergismo entre dos compuestos antimicrobianos se produce cuando hay un descenso de 2 Log_{10} en el recuento de colonias bacterianas luego de 24 horas, comparándolo con lo que sucede con el compuesto más activo administrado solo.

En cambio, hay indiferencia si la caída en el conteo es menor a 2 Log₁₀ o si hay un leve crecimiento en el mismo tiempo; y antagonismo si hay al menos un incremento de 2 Log₁₀ (Pillai y col., 2005). Las técnicas de curva de muerte bacteriana y del tablero de damas son las más utilizadas para establecer la existencia de sinergismo entre compuestos (Bhardwaj y col., 2016).

Al evaluar combinaciones de AE y cloxacilina frente a las cepas de referencia, SARM y los aislamientos salvajes de *S. aureus* seleccionados se pudo observar un efecto sinérgico, ya que los valores CFI obtenidos fueron ≤ 1 , con excepción de lo ocurrido para los 3 aislamientos sensibles a pH 6.5 donde, el valor obtenido fue de 1.1. Se evidenció una importante disminución en la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano. En la combinación AE/cloxacilina, el efecto bactericida se mantuvo incluso cuando el pH del caldo se redujo de 7.4 a 5.0, de manera similar a lo mencionado anteriormente cuando se evaluó el comportamiento del AE solo. De igual modo, cuando el medio de cultivo se acidificó, la concentración de cloxacilina, en la mezcla AE/cloxacilina, se redujo incluso hasta 10 veces para inhibir el microorganismo en el caso de los aislamientos sensibles. Frente a la cepa resistente a meticilina (SARM 5-I) se obtuvieron valores de CFI de 0.53, que se mantuvieron con los cambios de pH, modificándose solo las concentraciones de antibiótico y AE. Es decir que, en la mezcla, las concentraciones de la esencia y de cloxacilina son menores, y esta disminución es mayor al acidificar el medio. De este modo, considerando el efecto sinérgico entre el extracto y el antibiótico, y sumándole la acción de la acidez del medio a pH 5.0, y en presencia de 1.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de AE, la cantidad de cloxacilina necesaria para inhibir la cepa meticilino-resistente sea 512 veces inferior, respecto de lo que se necesita para lograr la inhibición solo con el β -lactámico a pH 7.4.

Como se mencionó en la introducción, aún no existen trabajos publicados en los que se haya estudiado la interacción farmacológica entre el AE de *M. armillaris* y cloxacilina. En la bibliografía se encuentra mucha información acerca de la actividad antimicrobiana de otra especie de *Melaleuca*, *M. alternifolia* (árbol del té). El AE de esta planta ha sido investigado en busca de combinaciones sinérgicas,

utilizando la técnica de tablero de damas frente a *S. aureus*. Sin embargo, los resultados obtenidos al combinar su AE con diferentes antibióticos como vancomicina (LaPlante, 2007), tobramicina (D'Arrigo y col., 2010) y ciprofloxacina (Van Vuuren y col., 2009) arrojaron un efecto de indiferencia o antagonismo.

Chaves y col. (2018) observaron la presencia de un efecto sinérgico entre el AE de *Eucalyptus camaldulensis* y β -lactámicos como cefalexina, amoxicilina y ampicilina frente a cepas SARM. Este AE presentó en su composición una concentración de 1.8 cineol, α -pineno y α -terpineol (76.93%, 7.15% y 2.39%, respectivamente) similar a nuestro AE de *M. armillaris* evaluado.

Al llevar a cabo el análisis de las curvas de crecimiento bacterianas se observó que hubo un incremento en el recuento bacteriano para el control de todas las cepas a los 3 pHs, mientras que a 0.5 CIM (considerando la CIM de la mezcla con menor CFI) el crecimiento se produjo a pH 7.4 y 6.5. A pH 5.0, para esta concentración hubo inhibición bacteriana. Al igual que ocurre con la cloxacilina sola, concentraciones de 0.5 CIM de la mezcla producen velocidades de crecimiento (μ) y densidades poblacionales máximas (MPD) menores, y mayores tiempos de latencia (LPD) respecto del control. De manera similar que con el antimicrobiano solo, estos valores se modificaron al disminuir el pH.

En el caso de las curvas de muerte bacteriana, el análisis con el modelo sigmoideal nos permitió analizar la incidencia del pH y la concentración de AE-cloxacilina sobre las cepas de *S. aureus*. La presencia de AE permite obtener valores de T_{150} menores con concentraciones más bajas de cloxacilina, en comparación a cuando se evaluó sola. Concentraciones de 2, 4 y 8 CIM de la mezcla permitieron obtener una caída del recuento bacteriano similar al inóculo inicial (N_{max} similar a N_0), con lo cual se estaría eliminando prácticamente todas las bacterias viables. Esto ocurre a los 3 pHs evaluados, lo que resalta nuevamente una mayor sinergia AE-cloxacilina a pH ácido.

La actividad combinada del AE y cloxacilina, también se evidenció en el efecto bactericida, establecido por el índice E. Como se indica en el apartado Resultados, el índice de actividad antibacteriana (E) es la diferencia entre los valores Log_{10} del

número de bacterias viables (UFC/mL) al inicio (nt-0) y al final del ensayo (nt- 24). Con la finalidad de evaluar E, aplicamos tres puntos de corte teóricos: a) Efecto bacteriostático: $E = 0$; no hay cambios en el valor de nt-0: b) Efecto bactericida: $E = -3$; hay reducción de $\geq 3 \text{ Log}_{10}$ de nt-0 por eliminación del 99.9% de las bacterias iniciales y c): Efecto de erradicación virtual de bacterias: $E = -4$; hay reducción de $\geq 4 \text{ Log}_{10}$ (eliminación del 99.99%) respecto del Log de nt-0.

Se observó una disminución en el inóculo bacteriano inicial $-\text{Log}_{10}$ (UFC/mL)- en un factor de 3 en 24 horas tanto para el antibiótico solo como en la mezcla en el caso de las cepas sensibles al antimicrobiano (SA13, SA96, SA139 y ATCC 29213). Sin embargo, la concentración del antibiótico en presencia del AE fue claramente menor y el valor de E obtenido fue más cercano al efecto de erradicación virtual ($E = -4$) que la concentración necesaria cuando se aplica el β -lactámico solo. En un estudio realizado por Nascimento y col. (2007) el AE de *Eremanthus erythropappus* se evaluó en combinación con ampicilina (antibiótico β -lactámico) frente a *S. aureus*, lográndose un efecto bactericida sinérgico después de una incubación de 24 horas. En el caso de la cepa SARM 5-I la caída del inóculo inicial a las 24 h en presencia de la mezcla siguió un patrón similar al obtenido con los aislamientos salvajes sensibles. Es decir que la curva correspondiente a las combinaciones AE/cloxacilina se encuentran desplazadas hacia valores menores de concentración de β -lactámico. Además, esto se mantiene con la acidificación del medio. A pH 7.4 se requieren 12.5 $\mu\text{L/mL}$ de AE y 32 $\mu\text{g/mL}$ de cloxacilina para lograr un efecto bactericida ($E = -3$), mientras que en el caso del antibiótico solo, se requieren 2048 $\mu\text{g/mL}$. A pH 5.0 el efecto bactericida de la mezcla se obtiene con 6.25 $\mu\text{L/mL}$ de AE y 4 $\mu\text{g/mL}$ de cloxacilina comparado con los 8 $\mu\text{g/mL}$ de cloxacilina para dicho antibiótico solo.

Con la modelización del efecto antibacteriano mediante un modelo sigmoideal similar al de respuesta máxima se logró un buen ajuste de los datos, con valores de R muy cercanos a 1. Se puede observar claramente como la concentración necesaria para lograr el 50% (C_{50}) del efecto de caída del recuento bacteriano máximo (E_{max}) para cloxacilina disminuye en forma extremadamente significativa

al acidificar el medio desde pH 7.4 a 6.5 y 5.0 ($p < 0.0001$). Pero es aún más relevante la disminución de la C_{50} de cloxacilina al adicionar al medio AE de *M. armillaris*, lo que nuevamente es potenciado en forma extremadamente significativa a pH ácido ($p < 0.0001$). Para la cepa SARM5-I la C_{50} de cloxacilina a pH 7.4 fue de 535.835 $\mu\text{g/mL}$ y por adición de 6.25 $\mu\text{L/mL}$ de AE disminuyó a 7.348 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que a pH 5.0 la C_{50} fue de 1.724 $\mu\text{g/mL}$ y se redujo a 0.463 $\mu\text{g/mL}$ por agregado de 1.6 $\mu\text{L/mL}$ del AE. El comportamiento de las cepas sensibles fue similar, siendo de gran relevancia lo observado con la cepa meticilino-resistente, dado que la restauración de la sensibilidad al antibiótico fue notoria.

En conclusión, fue posible reducir, *in vitro*, la concentración de cloxacilina necesaria para inhibir a las cepas de *S. aureus* sensibles y meticilino-resistente mediante su combinación con AE. Considerando que la cloxacilina es un antimicrobiano del grupo de los β -lactámicos con buena actividad frente a *S. aureus* y con amplio uso en medicina veterinaria, el AE aumenta el efecto antibacteriano de la misma incluso cuando el pH intracelular fuera más ácido que el del medio extracelular. Esto es importante para el tratamiento de infecciones intracelulares, en las que *S. aureus* se internaliza dentro de los fagolisosomas porque aumentaría la probabilidad de éxito terapéutico. Los resultados obtenidos sugieren un aumento de la susceptibilidad a los β -lactámicos debido al pH ácido que prevalece en las vacuolas donde vive y prospera *S. aureus*, lo que se vería facilitado por la acción del AE de *M. armillaris*. Como se mencionó anteriormente, el pH ácido provoca un cambio conformacional de la proteína diana de acción (PBP2a), lo que aumenta la afinidad de su centro catalítico por el β -lactámico (Craig, 1998; Mensa y col., 2013). De este modo, la sinergia que fue encontrada entre la cloxacilina y el AE en condiciones ácidas podría tener lugar en el interior celular presentando un efecto importante contra *S. aureus* cuando es refractario a los mecanismos inmunológicos. Estos hallazgos se convierten en una valiosa alternativa para el tratamiento de infecciones estafilocócicas persistentes. El AE de *M. armillaris* es una buena opción a considerar en el diseño de futuras

formulaciones para evaluar los efectos *in vivo*, a fin de maximizar la eficacia de los antimicrobianos actuales y futuros.

IV.4. Actividad antimicrobiana de rifaximina y su combinación con AE de *M. armillaris* frente a *S. aureus*

IV.4.1. Rifaximina

La rifaximina es un antibiótico semisintético derivado de la rifamicina perteneciente a la familia de las ansamicinas (Figura 75). Este antimicrobiano tiene acción bactericida y es de amplio espectro. Presenta como mecanismo de acción la inhibición de la síntesis del ARN bacteriano (Gobernado y Ponce, 2004), mediante unión a la ARN polimerasa dependiente del ADN bacteriano en el lugar del híbrido ADN-ARN inhibiendo la unión fosfodiéster, lo que ocasiona el bloqueo de la síntesis de ARN y en consecuencia inhibe la transcripción (Hartmann y col., 1967). Si bien las ansamicinas son de amplio espectro con actividad sobre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, la sensibilidad de estas últimas es mayor. En el hombre no se absorbe por vía oral, alcanzando una concentración muy alta en la luz intestinal, por lo que se la indica para el tratamiento de enfermedades infecciosas del aparato gastrointestinal (Manjarrez y col., 2012). En medicina veterinaria, se usa principalmente en el tratamiento de enfermedades que afectan la piel en todas las especies animales, en la terapia y la profilaxis de la mastitis en vacas (Malinowski y col., 2008), y en el tratamiento de perros con enteropatía crónica (Menozzi y col., 2016).

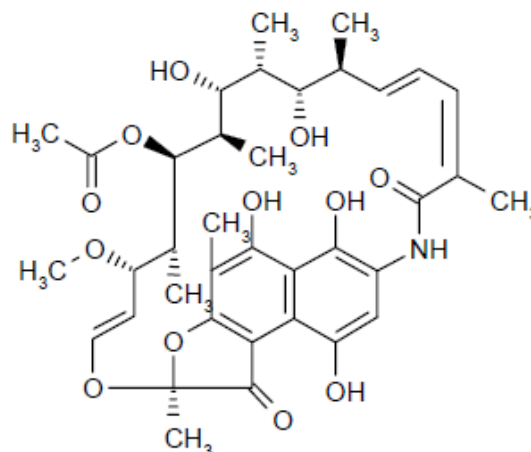


Figura 75. Estructura molecular de la rifaximina.

Los valores de CIM que se encuentran en la bibliografía frente a *S. aureus* para la rifaximina son bajos. Hoover y col. (1993) encontraron para cepas de esta especie valores que oscilan entre ≤ 0.015 y $0.03 \mu\text{g/mL}$, a diferencia de Pistiki y col. (2014) quienes obtuvieron CIMs $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$.

En el presente estudio, la rifaximina presentó una elevada actividad antimicrobiana frente a las cepas de *S. aureus* ATCC 29213, SA13, SA96 y SA139. Para este antibiótico no se evaluaron cepas resistentes debido a que no encontramos aislados de *S. aureus* resistentes a las ansamicinas. La CIM obtenida fue baja y similar para todas las cepas analizadas ($0.032 \mu\text{g/mL}$), lo cual indica una importante potencia antibiótica frente a *S. aureus*. Este valor de concentración inhibitoria fue independiente del pH, ya que no se observaron cambios en los valores CIM. Sin embargo, la CBM varió al analizar la actividad antimicrobiana al pH más ácido. A pH 7.4 y 6.5, la CBM fue $0.512 \mu\text{g/mL}$ para todos los microorganismos, mientras que a pH 5.0 disminuyó en forma muy significativa a $0.128 \mu\text{g/mL}$ para los 3 aislamientos salvajes ($p < 0.001$) y a $0.064 \mu\text{g/mL}$ para la cepa ATCC 29213. Un resultado similar fue reportado por Sanchez y col. (1988) para la rifampicina frente a cepas de *S. aureus*, en donde la CBM a pH 5.0 fue menor que a pH 7.0. Sin embargo, estos autores encontraron que la CIM también se veía disminuida.

Al evaluar, mediante curva de muerte bacteriana, como incide la presencia de rifaximina en el crecimiento de la cepa de referencia de *S. aureus* se observó crecimiento a 0.5 CIM (0.016 µg/mL), aunque menor que el control, a los 3 valores de pH. Concentraciones de 2, 4 y 8 CIM arrojaron curvas con un perfil similar, independientemente del pH del medio. Con ninguna de las concentraciones evaluadas (0.016-0.256 µg/mL) se logró obtener un descenso de al menos 3 Log₁₀ UFC/mL del inóculo inicial a pH 7.4 y 6.5. En cambio, a pH 5.0 se obtuvo efecto bactericida para 2, 4 y 8 CIM, coincidiendo con lo observado para la CBM, cuyo valor fue de 0.512 µg/mL (pH 7.4 y 6.5) y 0.064 µg/mL (pH 5.0).

Algo similar ocurrió en el caso de los aislamientos salvajes SA13 y SA96, donde a pH 7.4 y 6.5 no se lograron ver efectos bactericidas con las concentraciones evaluadas. Mientras que a pH 5.0 el inóculo inicial cayó más de 3 Log₁₀ UFC/mL con 4 y 8 veces la CIM, correspondiéndose con concentraciones de 0.128 y 0.256 µg/mL, respectivamente. Estos valores también resultaron acordes a los obtenidos en la determinación de CBM, ya que para estos aislamientos y a este pH la concentración fue de 0.128 µg/mL. En el caso del aislamiento SA139, se observó que a pH 7.4, se obtuvo un efecto bactericida a concentraciones de 8 CIM (0.256 µg/mL) mediante análisis de la curva de muerte bacteriana, mientras que, cuando se determinó la CBM en placas de microtitulación, esta fue 0.512 µg/mL. Por otro lado, a pH 6.5 se obtuvo efecto bactericida con concentraciones de 4 y 8 CIM, al igual que a pH 5.0.

La aplicación del modelo de Gompertz a las curvas de crecimiento bacteriano para el control y a 0.5 CIM de rifaximina permitió observar que la presencia en concentraciones subinhibitorias de este antimicrobiano produce disminución en la velocidad de crecimiento (μ) y de la máxima densidad poblacional alcanzada (MPD), como así también disminución en el período de latencia (LPD). Este comportamiento se mantuvo al variar el pH, indicando que las cepas de *S. aureus* presentan una disminución de su crecimiento con concentraciones subinhibitorias de rifaximina en el rango de pH de 7.4 a 5.0. La concentración de 1 CIM a pH 7.4 produjo una disminución del inóculo inicial en todas las cepas, por lo que no se

analizaron por el modelo de Gompertz. Sin embargo, a pH 5.0 todas las cepas presentaron una primera etapa de caída del recuento bacteriano y luego un recrecimiento a partir de las 12 horas de cultivo. Por ello a pH 5.0 se modelizaron como crecimiento.

Al analizar las curvas de muerte bacteriana con el modelo sigmoideal se observó que T_{150} disminuye al aumentar la concentración de rifaximina. Sin embargo, en todos los casos con concentraciones de 2, 4 y 8 CIM la caída de N_{max} es similar a el inóculo inicial N_0 , indicando que se eliminaría prácticamente la totalidad de las bacterias viables. Para este antibiótico, no está aún bien determinado si es un antimicrobiano tiempo o concentración dependiente. Varios estudios confirman que la rifampina (también conocida como rifampicina) actúa de esa última manera (Gumbo y col., 2007; Jayaram y col., 2003). Este antibiótico debe ser combinado con otros antimicrobianos, como penicilinas resistentes a las penicilinasas, vancomicina o trimetoprima, debido a que rápidamente selecciona cepas resistentes cuando es utilizada como monodroga. La resistencia a la rifampina se genera por mutación cromosómica, y se desarrolla con facilidad en la mayoría de las bacterias. Tales mutantes muestran cambios estables en la ARN polimerasa (sitio blanco de la acción antimicrobiana) impidiendo la fijación. Esto resulta como consecuencia de mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa bacteriana, donde se unen estos antibióticos (Goldstein, 2014). De manera que encontrar un coadyuvante natural para este tipo de compuestos es una prioridad.

IV.4.2. Combinación AE/rifaximina

En la bibliografía no se encuentran datos sobre combinaciones de ansamicinas con AEs frente a *S. aureus*. Solo existen algunos reportes de extractos naturales con este tipo de fármacos, por ejemplo, Liu y col. (2018) encontraron una fuerte actividad sinérgica entre rifampicina y miel manuka frente a cepas de *S. aureus* productoras de biofilm.

Combinando la rifaximina con el AE de *M. armillaris*, obtuvimos un efecto sinérgico, ya que se potenciaba el antibiótico, particularmente a pH 6.5 y 5.0, en todas las cepas y aislamientos analizados. A pH 7.4 se lograron obtener combinaciones que presentaban un sinergismo parcial con CFI=0.56, muy cercano al valor de CFI considerado de sinergismo (0.5). En este caso se logró disminuir, para las 4 cepas estudiadas, 16 veces la CIM de la rifaximina con una disminución a la mitad de la CIM correspondiente al AE aplicado solo. Al observar lo que sucedía a pH 6.5, el descenso en la concentración inhibitoria del antibiótico fue menor (4 veces para los aislamientos salvajes y 8 para la cepa de referencia). Sin embargo, aquí fue más evidente la disminución en la cantidad de AE necesaria para potenciar el antibiótico, ya que para todas las cepas el descenso fue de 4 veces la CIM del extracto vegetal. Por último, a pH 5.0, la CIM de rifaximina disminuyó 8 veces para todas las cepas. En este último caso es mucho más evidente la disminución en la concentración inhibitoria de la esencia, ya que nuevamente disminuyó en un factor de 4. Por lo tanto, a raíz de la importante reducción en las concentraciones inhibitorias a pH 5.0, tanto de AE como de antibiótico, se lograron obtener valores de CFI=0.38, marcando una importante sinergia entre ambos.

Similar a lo hallado con las combinaciones cloxacilina/AE, para las mezclas rifaximina/AE se observó un efecto potenciado por la suma de dos factores: combinación de los antibióticos con el extracto vegetal y acidificación del medio de cultivo (emulando condiciones intracelulares en donde se aloja el *S. aureus*).

Con la construcción de las curvas de muerte podemos ver como para la rifaximina sola, la caída en el recuento bacteriano es lenta, y se produce mayoritariamente entre las 12 y 24 horas de iniciado el ensayo. En cambio, al combinarlo con el AE de *M. armillaris*, se produce una fuerte caída en el recuento bacteriano a las 4 horas, alcanzando su máximo nivel a las 8 horas. A medida que se acidifica el medio de cultivo, tanto para la rifaximina sola como para su combinación con el AE, se observa un recrecimiento a partir de las 12 horas para concentraciones subinhibitorias, es decir a 0.5 CIM. También se observó que las

pendientes de las curvas fueron más marcadas con la mezcla que con el AE solo, ya que este produce la mayor caída en el conteo de células viables a las 12 horas.

Al ajustar los datos de muerte bacteriana al modelo sigmoïdal para concentraciones de 1, 2, 4 y 8 veces la CIM de la mezcla, se encontró que T_{150} fue menor al incrementar la concentración de rifaximina y de AE en la mezcla. En cuanto a las curvas correspondientes a 0.5 CIM, que presentaron un aumento en el recuento final de bacterias respecto al inóculo inicial, no se logró un ajuste comparable con el modelo de Gompertz ya que en las curvas se observó una disminución inicial de la población bacteriana para luego recrecer.

Al graficar la disminución del número de bacterias (Índice E) observamos como la curva en la que el *S. aureus* se enfrentó solo a la rifaximina se encuentra desplazada hacia valores más altos en la concentración de antibiótico. Esto quiere decir que la presencia de AE de *M. armillaris* favorece la disminución de la concentración de antibiótico necesaria para la inhibición del microorganismo. A su vez, a pH 7.4 y 6.5 la rifaximina no fue capaz de producir un efecto bactericida por sí sola a las concentraciones evaluadas, a diferencia de lo que ocurrió a pH 5.0. Mientras que la combinación con el AE de *M. armillaris* permitió lograr, con menores concentraciones, un efecto bactericida incluso cercano a la erradicación virtual. Por ejemplo, una mezcla de 0.004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rifaximina y 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de AE permitió alcanzar un efecto de erradicación virtual frente a los aislamientos de tipo salvaje a pH 7.4. Algo similar ocurrió con la cepa de referencia. La acidificación de los medios mejoró la actividad de la combinación AE/ rifaximina.

Con el análisis de los resultados de actividad antibacteriana en función de la concentración de rifaximina mediante el modelo sigmoïdal análogo al de respuesta máxima se puede observar que C_{50} es inferior en forma extremadamente significativamente para la combinación AE-rifaximina respecto de lo que sucede con el antibiótico solo frente a *S. aureus* a los 3 pHs evaluados ($p < 0.0001$). Para la cepa de referencia y los aislados salvajes, la C_{50} de rifaximina es 20 veces menor en presencia de AE a pH 7.4, pero a pH 5.0 la reducción es menor.

Si bien la disminución de C_{50} es de menor magnitud al acidificar el medio, menor es la cantidad de AE utilizada (4 veces menos para todas las cepas).

La rifaximina demostró ser un antibiótico potente frente a *S. aureus*, bajo nuestras condiciones experimentales. Estos resultados son hallazgos de gran valor para el tratamiento de infecciones estafilocócicas de difícil resolución, considerando que por el avance de la resistencia antimicrobiana las opciones de tratamiento son cada vez más limitadas.

IV.5. Actividad antimicrobiana de eritromicina y su combinación con AE de *M. armillaris* frente a *S. aureus*

IV.5.1. Eritromicina

Los macrólidos pertenecen a uno de los grupos de antibióticos utilizados contra las infecciones causadas por *S. aureus*. Se los considera agentes bacteriostáticos, aunque pueden ejercer efecto bactericida en determinadas condiciones. Actúan sobre la subunidad ribosomal 50S e interfieren en la síntesis proteica. Son particularmente activos contra bacterias Gram-positivas y micoplasmas (Sádaba y Azanza, 2005; Lucas y col., 2007). Entre las ventajas de los macrólidos podemos mencionar las altas concentraciones intracelulares alcanzadas, amplia distribución en el organismo, semivida de eliminación prolongada y actividad contra importantes patógenos microbianos. La acumulación intracelular dentro de células fagocíticas es muy interesante, ya que puede generar un efecto inmunomodulador, observado en la mayoría de los macrólidos (Prescott, 2002). Uno de los antimicrobianos pertenecientes a este grupo es la eritromicina (Figura 76). Su uso excesivo en animales de producción puede favorecer una mayor aparición de resistencia a estos fármacos. Son varios los mecanismos de resistencia desarrollados por *S. aureus* que afectan a la actividad de los macrólidos (Piatkoswka y col., 2012).

Existen básicamente 3 mecanismos de resistencia de las bacterias frente a los macrólidos. En primer lugar, por la modificación del sitio diana por metilación o mutación impidiendo la unión del antibiótico a su objetivo ribosomal. Un segundo

mecanismo implica el eflujo del antibiótico, y un tercero la inactivación del fármaco. La modificación de la diana ribosomal confiere resistencia de amplio espectro a macrólidos mientras que el flujo de salida y la inactivación afectan solo a algunas de estas moléculas (Leclercq, 2002).

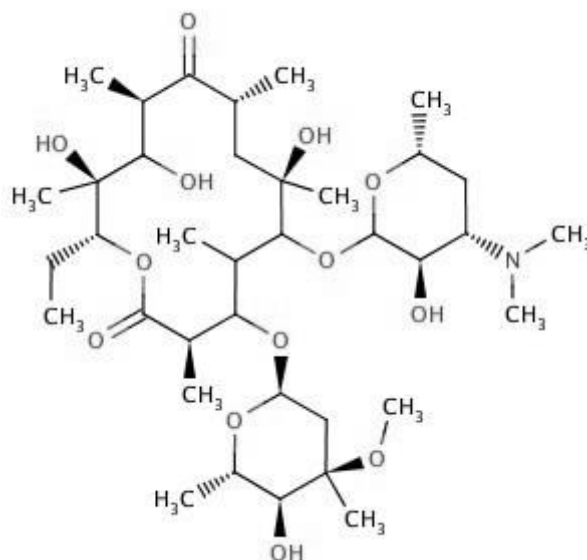


Figura 76. Estructura molecular de la eritromicina.

Una de las propiedades más relevantes de los macrólidos es su gran volumen de distribución (Lucas y col., 2007; Mulazimoglu y col., 2005; Prescott, 2002). Estos antibióticos tienen la capacidad de concentrarse en los tejidos y acumularse en el interior de células eucariotas. Esta acumulación podría deberse a la difusión de la forma molecular en estado no protonado a través de la membrana y a la retención de la forma protonada en el interior de los compartimientos celulares con pH ácido, como los lisosomas. Debido al gran volumen de distribución de estos fármacos, las concentraciones que se encuentran en sangre suelen ser bajas, mientras que las logradas en los tejidos y en el interior celular son altas, siendo una gran ventaja para el tratamiento de infecciones localizadas a este nivel (Lucas y col., 2007; Mulazimoglu y col., 2005).

Es posible que a nivel intracelular existan factores moduladores capaces de aumentar o disminuir la actividad antibiótica. Estos factores posiblemente se deban a la alteración de la susceptibilidad bacteriana, modificaciones en la actividad o diferente biodisponibilidad del fármaco en los distintos

compartimentos subcelulares. Por ejemplo, puede darse ausencia de actividad debido a cambios en el pH cuando los macrólidos ingresan al lisosoma cuyo pH interno es ácido, ya que estos antibióticos pierden aproximadamente el 90% de su actividad por cada unidad de pH que disminuye (Shryock y col., 1998). La gran acumulación de antibiótico a nivel intralisosomal no implica una buena actividad antibacteriana, pues la forma no ionizada es la única que posee acción antibacteriana. Los antibióticos no solo necesitan penetrar la célula eucariota y alcanzar dentro de esta al microorganismo patógeno, también necesitan conservar su actividad a dicho nivel.

Al evaluar la CIM de eritromicina frente a *S. aureus* obtuvimos para los aislamientos salvajes sensibles (SA13, SA96 y SA139) y para la cepa ATCC 29213 una CIM de 0.5 µg/mL, mientras que en el caso de los aislados resistentes (SA78A, SA79A y SA86B) este valor fue muy elevado, 1024 µg/mL. Modificamos el pH del medio de cultivo con el fin de emular las condiciones subcelulares a las cuales se encuentra asociado el *S. aureus* de vida intracelular, asumiendo que el cambio de pH, sería un factor limitante en la acción del antimicrobiano, basándonos en estudios previos realizados en el LEfYT con otros macrólidos como la azitromicina (Moncada Cárdenas, 2017) en coincidencia con la bibliografía en donde también se reporta degradación de eritromicina en presencia de un medio ácido (Prescott, 2002). Pero en este caso, nuestro objetivo era intentar revertir esta pérdida de potencia antibiótica por la combinación con AE de *M. armillaris*.

Al acidificar el medio de cultivo, se observó una sustancial pérdida de potencia, lo cual se hizo evidente por el aumento de hasta 2 veces su CIM a pH 6.5 y 16 veces su CIM a pH 5.0 en comparación a cuando las mismas cepas fueron analizadas al pH fisiológico de 7.4 en el caso de los aislamientos sensibles. En cuanto a los aislamientos resistentes, la pérdida de potencia llevó a la CIM a valores superiores a 1024 µg/mL, corroborando de esta manera lo mencionado en la bibliografía en cuanto a la pérdida de potencia de la eritromicina en medio ácido (Lucas y col., 2007; Prescott, 2002).

Como se mencionó anteriormente, la eritromicina es un antibiótico bacteriostático. La relación CBM/CIM mayor a 4 es indicativo de que un compuesto es bacteriostático (Pankey y Sabath, 2004), relación que obtuvimos en nuestro estudio. Los aislamientos sensibles a eritromicina y la cepa de referencia ATCC 29213 presentaron a pH 7.4 una CBM 64 veces superior a la CIM, de 256 a pH 6.5 y a pH 5.0 se puede decir que el incremento fue mayor a 32 veces (ya que la CIM fue establecida como $>256 \mu\text{g/mL}$). Por otro lado, la CBM de los aislamientos resistentes al macrólido fue establecida como $>1024 \mu\text{g/mL}$, evidenciándose un incremento respecto de la CIM a pH 7.4 solamente, ya que a pH 5.0 también estos valores fueron determinados como $>1024 \mu\text{g/mL}$. Queda claramente confirmada la extrema pérdida de potencia que sufre este antibiótico en medios ácidos.

Al analizar las curvas de muerte bacteriana para *S. aureus* frente a eritromicina, se puede observar (Figuras 41 a 47) como a las concentraciones evaluadas, el antimicrobiano actúa en forma bacteriostática ya que tras 24 horas de contacto no se logró obtener una caída importante del recuento bacteriano, independientemente del pH y del perfil de sensibilidad de las cepas. La incidencia del pH se observa en la cantidad de antibiótico necesaria para lograr un mismo efecto, pues las concentraciones en todos los casos aumentan con la acidificación del medio de cultivo.

En las figuras 65 a 71 se puede ver al analizar la caída del recuento bacteriano en función de la concentración del antibiótico que en ningún caso se observó una caída de 3 Log_{10} (UFC/mL) de bacterias, considerando finales menos iniciales, lo cual es compatible con el comportamiento de un fármaco bacteriostático.

Para la modelización matemática de los datos de crecimiento y muerte bacteriana las cepas salvajes fueron agrupadas según su CIM, de modo que los parámetros obtenidos corresponden a la media de estos para la cepa de referencia, las 3 cepas sensibles (SA13, SA96 y SA139) y las 3 cepas resistentes (SA78A, SA79A y SA86B) a eritromicina. Con el análisis de las curvas de crecimiento (Control y 0.5 CIM de eritromicina) mediante el modelo de Gompertz se encontró

que la velocidad de crecimiento (μ) y la máxima densidad poblacional (MPD) para *S. aureus* disminuyen en presencia de concentraciones subinhibitorias, mientras que la duración del período de latencia (LPD) se extiende. Con la concentración equivalente a 1 CIM hubo diferencias entre las cepas, observándose crecimiento para algunas y muerte para otras por lo que, según el caso, fueron modelizadas por Gompertz o por el modelo sigmoideal.

El modelo sigmoideal fue aplicado para modelar las curvas de muerte (cepa de referencia y aislados sensibles) a concentraciones de 2, 4 y 8 CIM a los 3 valores de pH, mientras que para 1 CIM se aplicó solo a pH 7.4 y 6.5, ya que a pH 5.0 se obtuvo crecimiento de la población bacteriana. Los valores de T_{150} fueron mayores que los correspondientes a cloxacilina, y en mayor proporción a los observados para la rifaximina. Para las cepas resistentes a eritromicina, a pH 7.4 la máxima concentración evaluada fue 4 veces la CIM (4096 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que a pH 6.5 y 5.0 se evaluó hasta 2 CIM (4096 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los valores de T_{150} aumentan considerablemente al acidificar el medio de cultivo.

IV.5.2. Combinación AE/eritromicina

La combinación del AE de *M. armillaris* con eritromicina resultó interesante, particularmente en el caso de los aislamientos salvajes de *S. aureus* resistentes a este macrólido. Estos aislamientos (SA78A, SA79A y SA86B) presentaron valores de CIM muy elevados (1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y al acidificar el medio de cultivo la pérdida de potencia incrementó aún más este valor. La combinación con el extracto vegetal permitió obtener mezclas cuyo CFI fue cercano a 0.5, indicando sinergismo parcial. Pequeñas cantidades de AE de *M. armillaris* lograron disminuir notablemente la concentración necesaria para inhibir estas cepas de *S. aureus* con elevada resistencia a eritromicina.

A pH 7.4 los 3 aislamientos resistentes presentaron valores CFI de 0.56, en los que la cantidad de antibiótico necesaria para la inhibición disminuyó 16 veces (1024 frente a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de 6.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de AE (la CIM del AE disminuyó a la mitad). A pH 6.5, el coeficiente CFI fue menor a 0.65 (no lo pudimos

establecer exactamente ya que la CIM del antibiótico solo en esta condición se determinó como mayor a 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En este caso la CIM del antibiótico disminuyó al menos 8 veces (>1024 a $128 \mu\text{g}/\text{mL}$) pero en presencia de $3.1 \mu\text{L}/\text{mL}$ de la esencia, es decir que el AE disminuyó su CIM a la mitad. Por último, en lo que respecta a pH 5.0 la situación fue muy similar a la observada a pH 6.5, ya que la CIM de la eritromicina se redujo de >1024 a $128 \mu\text{g}/\text{mL}$, con la diferencia de que la cantidad de extracto vegetal fue aún menor. La cantidad de AE en la mezcla a este pH fue de $1.5 \mu\text{L}/\text{mL}$.

Dentro de los diferentes mecanismos de resistencia a macrólidos se puede mencionar la modificación del sitio blanco (por metilación del ARNr, mutación del ARNr 23S, mutación de las r-proteínas), síntesis de pequeños péptidos, inactivación enzimática y eflujo activo (Lucas y col., 2007). Es difícil poder establecer mediante que mecanismo el AE de *M. armillaris* ejerce acción sinérgica con la eritromicina. La gran cantidad de compuestos que se encuentran en el extracto genera una acción en diferentes blancos bacterianos. El 1.8 cineol (principal componente encontrado en el AE de *M. armillaris*) es capaz de desintegrar la membrana celular y reducir el citoplasma, generando daños en la estructura de *S. aureus* (Li y col., 2014). En cuanto a los demás componentes de este AE, se ha postulado que el α -Pino, Terpinen-4-ol, sabineno, β -Mirreno y α -Terpineno también estarían implicados en la interacción con la membrana celular, donde se disuelven en la bicapa fosfolipídica alineándose entre las cadenas de ácidos grasos (Hayouni y col., 2008). Esta distorsión física de la estructura causaría expansión y desestabilización de la membrana, aumentando la fluidez de esta, por lo que a su vez aumentaría la permeabilidad pasiva (Hayouni y col., 2008).

Una posible explicación de la sinergia entre el AE de *M. armillaris* y la eritromicina sería que la desestabilización en la membrana, pared celular y una eventual disminución en la actividad de bombas de eflujo aumentaría la llegada de antibiótico al interior celular bacteriano, por lo que se concentraría aún más y facilitaría la interacción con el sitio de acción a nivel ribosomal.

Lo mencionado anteriormente se corrobora con Piatkoswka y col. (2012), quienes estudiaron cepas de *S. aureus* resistentes a eritromicina. En este caso, dicha resistencia fue consecuencia de una fuerte disminución en la permeabilidad de la pared celular a la eritromicina. Según estos autores, esta variante de los mecanismos de resistencia resulta ser la más eficiente, creando las cepas más resistentes, con un valor de CIM superior a 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las cepas altamente resistentes no presentaron gran acumulación del macrólido a nivel intracelular al desestabilizar la membrana celular, por lo cual la barrera que frena su ingreso estaría en la pared bacteriana. Entre otras conductas observadas, las células de cepas altamente resistentes tendían a formar agregados más grandes y estables, lo que indica que difieren en la composición de la pared celular de las menos resistentes. Es posible entonces que la actividad del AE tenga repercusión a nivel de la pared celular.

Un aspecto importante que presentó diferencias fue el cambio en las formas de las curvas de muerte bacteriana. Todas las cepas cuando se enfrentaron a la eritromicina sola en las 3 condiciones de pH presentaron curvas de crecimiento que se corresponden con un antibiótico bacteriostático, lo cual también se vio reflejado en que las relaciones CBM/CIM fueron en todos los casos superiores a 4 (como se mencionó anteriormente esto es común para antimicrobianos bacteriostáticos). A su vez, al modelizar estas curvas de muerte para las cepas resistentes a eritromicina, con las concentraciones máximas evaluadas hubo una importante diferencia entre la concentración del inóculo inicial (N_0) y la caída máxima de este (N_{max}). El valor de N_0 fue superior a N_{max} , indicando que no se logró un efecto bactericida frente a toda la población bacteriana.

Con el agregado de AE al medio de cultivo, se lograron obtener efectos bactericidas. Mediante el análisis de las curvas de muerte bacteriana se puede observar como con menores concentraciones de eritromicina se obtienen valores de N_{max} cercanos a N_0 , indicando la eliminación del inóculo de *S. aureus*. Esto es particularmente importante en las cepas resistentes a eritromicina, donde no solo

N_0 es cercano a N_{max} , sino que el tiempo necesario para alcanzar la mitad de N_{max} es menor y con concentraciones más bajas de eritromicina por acción del AE.

Estos resultados se condicen con lo reflejado en el análisis del índice E. De manera similar a lo observado para cloxacilina y rifaximina, los gráficos de Índice E vs. Log_{10} concentración de antibiótico, muestran como la curva está desplazada hacia concentraciones menores de eritromicina en presencia de AE. Por otro lado, queda claramente expuesto como la adición del extracto vegetal favorece el alcance del efecto bactericida. Nuevamente, la acidificación del medio de cultivo presenta un efecto similar al descrito anteriormente con el análisis de los valores de CIM para el antibiótico.

Utilizando el modelo sigmoideal similar al de respuesta máxima para ajustar los datos del índice antibacteriano en función de la concentración de eritromicina permite observar lo que ocurre con el efecto máximo (E_{max}) y la concentración necesaria (C_{50}) para lograr el 50% de E_{max} . Para la cepa de referencia y los aislamientos sensibles a este macrólido fue posible ajustar de manera óptima al modelo con R cercanos a 1 en todas las condiciones evaluadas. En cambio, al evaluar las cepas resistentes utilizando solo eritromicina, los datos correspondientes a pH 6.5 y 5.0 no presentaron buenos ajustes (R cercanos a 0). Para la cepa de referencia y los aislamientos sensibles enfrentados a eritromicina es notorio como la C_{50} aumenta con el descenso del pH, siendo muy significativo el incremento a pH 5.0 ($p < 0.001$). A su vez, la presencia de AE permite que la C_{50} de eritromicina sea menor, en forma extremadamente significativa, que al utilizarla sola a los 3 pHs evaluados ($p < 0.0001$). Este parámetro a pH 7.4 disminuye de 543.167 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 189.503 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de AE. Para los aislamientos resistentes con mezclas correspondientes a 4 CIM a pH 6.5 y 2 CIM a pH 5.0 se alcanzan efectos bactericidas. Mientras que a pH 7.4 se requiere mayor cantidad de ambos para lograr ese efecto. Para estos aislamientos estas concentraciones fueron 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (con 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de AE) a pH 6.5 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (con 3.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de AE) a pH 5.0.

Considerando que los macrólidos tienen la capacidad de concentrarse a nivel intracelular, principalmente dentro de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (Gómez-Lus y col., 2005), estas concentraciones de eritromicina podrían alcanzarse a nivel subcelular. Se ha reportado que la eritromicina puede acumularse entre 4 y 38 veces más a nivel intracelular respecto del medio extracelular en macrófagos, 8 veces en polimorfos nucleares y de 6 a 12 veces en células epiteliales (Bosnar y col., 2005; Montenez y col., 1999; Villa y col., 1988). Por lo tanto, es factible alcanzar estos niveles, transformándose su combinación con AE de *M. armillaris* en una buena alternativa a evaluar para el tratamiento del *S. aureus* a nivel intracelular.

IV.6. Evaluación de la viabilidad celular de PMNs frente al AE de *M. armillaris*

La determinación de actividad intracelular del AE de *M. armillaris* frente a PMNs no ha sido reportada todavía en la bibliografía. En el presente estudio de Tesis Doctoral se evaluó el efecto de este AE sobre PMNs aislados de bovinos con la intención de determinar la actividad antimicrobiana de las mezclas AE-antibiótico descritas anteriormente frente a *S. aureus* internalizados en este tipo celular. Sin embargo, no se logró avanzar debido a que el AE resultó ser tóxico en un amplio rango de concentraciones ensayadas (7.5-0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$). La mortalidad fue del 100% al contacto con el AE, excepto con la concentración más baja evaluada, donde la viabilidad a las 24 horas para una concentración de 0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ fue de 20%. Caldefie-Chézet y col. (2006) encontraron que PMNs, aislados de humanos, expuestos al AE de *M. alternifolia* al 1% (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) perdían en un 50% su viabilidad a las 2 horas, mientras que frente a concentraciones del AE al 0.1 % no había pérdida de viabilidad por lo menos durante dos horas. En cambio, utilizando células periféricas mononucleares humanas frente a 0.1 % del AE la viabilidad cae al 20% a la media hora y a cero a las 3 horas, pero frente a una concentración de 0.01% la viabilidad se mantiene incluso a las 24 horas. En otro estudio llevado a cabo por Tullio y col. (2012), se evaluó la actividad intracelular del AE de *Thymus vulgaris* frente a *Candida albicans* internalizada en PMNs

humanos. Las concentraciones del AE utilizado fueron de 0.25 y 0.5%, reportando actividad intracelular frente a *C. albicans*, sin embargo, los autores no mencionan la realización de ensayos de viabilidad por efecto del AE sobre los PMNs. En este tipo de ensayo la reducción en el recuento de microorganismos podría ser el resultado de la muerte intracelular por el antimicrobiano, lisis de las células fagocíticas con la liberación y posterior destrucción de los microorganismos por el antimicrobiano extracelular, eliminación de microorganismos por antimicrobiano residual después de la rotura de las células por sonicación al final del experimento y la estimulación de los mecanismos de destrucción intracelular por acción del antimicrobiano (Easmon, 1979). Por ello es fundamental establecer si las células eucariotas mantienen su viabilidad frente al compuesto ensayado.

En un trabajo posterior realizado por Tullio y col. (2019) se evaluó la toxicidad de los AEs de *M. alternifolia* y de “*Mentha de Pancalieri*” sobre PMNs, hallando que estos disminuían drásticamente la viabilidad con 0.25% (correspondiente a 0.25 de la CIM observada) de los AEs a los 30 minutos de haber sido expuestos.

Una posible solución a este problema de toxicidad de los AEs sobre los PMNs podría ser el desarrollo de nanoestructuras para su encapsulación a modo de “delivery” de moléculas al medio intracelular. Las nanopartículas penetran en la membrana celular y los orgánulos subcelulares, depositándose en el sitio infectado, permaneciendo en forma intracelular durante mucho tiempo y liberando su carga a través de los poros que se presentan en las membranas de las nanopartículas (Zhou y col., 2018). Existen nanomateriales capaces de incorporar una o más moléculas sin tener efecto sobre la carga de estas y aumentar así su acción farmacológica. Además, permiten una dosificación uniforme del fármaco, aumentar su biodisponibilidad, localizarlo en el sitio infectado, disminuir el tiempo de tratamiento y los efectos secundarios (Garg y col., 2015).

V. CONCLUSIONES

Luego de analizar y discutir los resultados obtenidos de este estudio, podemos mencionar las siguientes conclusiones más relevantes:

1.- El AE de plantas de *M. armillaris* cultivadas en las cercanías de la ciudad de La Plata, obtenido mediante destilación de arrastre de vapor de agua, presentó una composición rica en 1.8 cineol, y en menor medida en limoneno y α -pineno, entre otros. Se obtuvo un rendimiento del 1.55% v/p, lo que no es un valor despreciable en términos productivos. Los parámetros fisicoquímicos obtenidos para este AE podrían ser utilizados en el control de adulteraciones en una posible futura explotación comercial del mismo.

2.- El AE de *M. armillaris* presenta importante actividad antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus*, la que mejora con la acidificación del medio de cultivo. Se destaca su efecto bactericida donde la CBM es cercana a la CIM.

3.- La cloxacilina, antibiótico de acción bactericida, mejora su potencia al acidificar el medio, incluso recupera su actividad frente a cepas SARM.

4.- La eritromicina disminuye su potencia a pH ácido y la rifaximina no varía su CIM al modificar el pH del medio entre 7.4 y 5.0, aunque si disminuye levemente su actividad bactericida.

5.- Considerando la necesidad de alcanzar al *S. aureus* intracelular donde el medio es más ácido que el extracelular, es importante que los antibióticos sean efectivos a este nivel. En este sentido tanto la cloxacilina como la rifaximina son buenos antimicrobianos para controlar estas infecciones si se logra facilitar el acceso de los mismos a la localización subcelular del *S. aureus*.

6.- Al combinar el AE con los 3 tipos de antibióticos mencionados se obtiene un efecto sinérgico, lo cual lo convierte en un excelente coadjuvante para estos.

7.- En el caso de la cloxacilina la sinergia con el AE fue muy importante y mejoró al acidificar el medio de cultivo, particularmente para la cepa SARM.

8.- En el caso de la rifaximina, frente a aislamientos de *S. aureus* sensibles presentó sinergismo con el AE de *M. armillaris*, el que mejoró sustancialmente al

bajar el pH del medio de cultivo. El antibiótico por si solo y las combinaciones tuvieron actividad bactericida.

9.- Las combinaciones con eritromicina resultaron en sinergismo parcial. Sin embargo, las CIMs disminuyeron en gran medida con la adición de pequeñas cantidades de AE, tanto para cepas sensibles como resistentes. La eritromicina tuvo actividad bacteriostática cuando se utilizó sola, pero al combinarse con la esencia se comportó como bactericida. Esto sumado a la gran capacidad de la eritromicina de acumularse a nivel intracelular permitiría considerarlo como alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones estafilocócicas.

10.- Los modelos matemáticos resultaron de gran utilidad para describir la actividad antibacteriana del AE, los antibióticos y sus combinaciones frente a *S. aureus*.

11.- El AE de *M. armillaris* fue citotóxico para células PMNs obtenidas de sangre bovina a las concentraciones evaluadas por lo que no se pudo evaluar la actividad intracelular *in vitro*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Abed N, Couvreur P. Nanocarriers for antibiotics: a promising solution to treat intracellular bacterial infections. Int J Antimicrob Agents. 2014; 43: 485–496. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.02.009.
2. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4ta. Edición. Allured, Carol Stream, IL, 2007.
3. Akers RM, Nickerson SC. Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2011; 16: 275–289. doi: doi.org/10.1007/s10911-011-9231-3
4. Algharib SA, Dawood A, Xie S. Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. Drug deliv. 2020; 27(1): 292–308. doi: doi.org/10.1080/10717544.2020.1724209
5. Amri I, Mancini E, De Martino L, Marandino A, Hamrouni L, Mohsen H, Bassem J, Scognamiglio M, Reverchon E, De Feo V. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils from Three *Melaleuca* Species Grown in Tunisia. Int J Mol Sci. 2012; 13(12): 16580-16591. doi: 10.3390/ijms131216580
6. Armorini S, Yeatts JE, Mullen KAE, Mason SE, Mehmeti E, Anderson KL, Washburn SP, Baynes RE. Development of a HS-SPME-GC-MS/MS Method for the Quantitation of Thymol and Carvacrol in Bovine Matrices and To Determine Residue Depletion in Milk and Tissues. J Agric Food Chem. 2016; 64(41): 7856-7865. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02899
7. Auldism M. 2011. Milk quality and udder health effects on processing characteristics. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. 2da. Edición. Mississippi, Estados Unidos, 2011, p. 902–907.

8. Babushok VI, Linstrom PJ, Zenkevich IG. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. J Phys Chem Ref Data. 2011; 40(4): 1-47. doi: doi.org/10.1063/1.3653552
9. Basdew IH, Laing MD. Mini-Review: Biological control of bovine mastitis using bacteriophage therapy. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Méndez-Vilas A (edt), España, Formatex Research Centre, 2011, p.386-393.
10. Bamgboye AI, Adejumo OI. Physicochemical properties of Roselle seed oil. Food Sci Nutr. 2010; 40(2): 186-92. doi: doi.org/10.1108/00346651011029219
11. Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van Bambeke F. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(3): 841-51. doi: 10.1128/AAC.50.3.841-851.2006
12. Beccaria C, Silvestrini P, Renna MS, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE, Baravalle C. *Panax ginseng* extract reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells but does not affect macrophages phagocytic activity. Microb Pathog. 2018; 122: 63-72. doi: 10.1016/j.micpath.2018.06.010
13. Begun J. *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a highthroughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. Infect immun. 2005; 73(2): 872-7. doi: 10.1128/IAI.73.2.872-877.2005
14. Berenbaum MC. A method for testing the synergy with any number of agents. J Infect Dis. 1978; 137(2): 122-30. doi: 10.1093/infdis/137.2.122
15. Bertocchi L, Varisco G, Farina R. Rifaximin and cephacetrile in a control program for *Staphylococcus aureus* infections in dairy herds. XXI World Buiatrics Congress Proc. 2000, p. 145. Punta del Este, Uruguay.

16. Bhardwaj M, Singh BR, Sinha DK, Kumar V, Prasanna Vadhana OR, Varan Singh S, Nirupama KR, Pruthvishree and Archana Saraf BS. Potential of Herbal Drug and Antibiotic Combination Therapy: A New Approach to Treat Multidrug Resistant Bacteria. Pharm Anal Acta. 2016; 7(11): 523. doi: 10.4172/2153-2435.1000523
17. Blowey R, Edmondson P. Mastitis Control in Dairy Herds. 2da Edición. Cabi, Wallingford, 2010.
18. Bogni C, Odierno L, Raspanti C, Giraud J, Larriestra A, Lasagno M, Reinoso E, Bettera S, Frigerio C, Pellegrino M, Dieser S, Vissio C, Frola I. War against Mastitis: Current Concepts on Controlling Bovine Mastitis Pathogens. En: Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, Mendez-Vilas A (edt). Singapore, World Scientific, 2011, p: 483-494.
19. Bosnar M, Kelnerić Z, Munić V, Eraković V, Parnham MJ. Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(6): 2372-7. doi: 10.1128/AAC.49.6.2372-2377.2005
20. Braga PC, Sala MT, Mancini L, Da Sasso M. Phagocytosis and intracellular killing of rokitamycin-exposed staphylococci by human polymorphonuclear leukocytes. Chemotherapy. 1998; 44: 42-49. doi: doi.org/10.1159/000007089
21. Bramley AJ, Cullor JS, Erskine RJ, Fox LK, Harmon RJ, Hogan JS, Nickerson SC, Oliver SP, Smith KL, Sordillo LM. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4ta. Edición. National Mastitis Council, Madison, WI, 1996, p. 1-3.
22. Bramley A, Cullor J, Erskine R, Fox L, Harmon R, Hogan J, Nickerson S, Oliver S, Larry Smith K, Sordillo L. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4ta. Edición. 421 S. Nine Mound Rd. Verona, WI: National Mastitis Council Publications, 2003.

23. Brown KN, Percival A. Penetration of antimicrobials into tissue culture cells and leucocytes. Scand J Infect Dis. 1978; 14: S251-S260.
24. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. Int J Food Microbiol. 2004; 94(3): 223–253. doi: doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
25. Byung-Wook C, Chun-Nam C, Soo-Mi L, Mee-Jeong K, Ju-Yeon P, Chang-Yeol Y, Song-Ee S, Suk K, Hu-Jang L. Therapeutic effect of oregano essential oil on subclinical bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. KSVS. 2015; 55(4): 253-257. doi: doi.org/10.14405/kjvr.2015.55.4.253
26. Caldefie-Chézet F, Fusillier C, Jarde T, Laroye H, Damez M, Vasson MP, Guillot J. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. Phytother Res. 2006; 20: 364–370. doi: doi.org/10.1002/ptr.1862
27. Calvino LF, Toselli FG, Weimann WR, Canavesio VR, Neder VE, Iguzquiza IA. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovine mastitis in the central dairy catchment area of Argentina. Rev Argent Microbiol. 2002; 34(3): 171-175.
28. Calvo J, Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enferm Infec Microbiol Clin. 2009; 27(1): 44-52. doi: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
29. Canton R, Morosini MI. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. FEMS Microbiol Rev. 2011; 35(5): 977–991. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00295.x
30. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(1): 50-62. doi: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006

31. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus Aureus*. Rev Mex Patol Clin Med Lab. 2014; 61(1): 28-40.
32. Chabir N, Romdhane M, Valentin A, Moukarzel B, Marzoug HN, Brahim NB, Mars M, Bouajila J. Chemical study and antimalarial, antioxidant, and anticancer activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm essential oil. J Med Food. 2011; 14(11): 1383–1388. doi: 10.1089/jmf.2010.0168
33. Chaves TP, Pinheiro REE, Melo ES, Soares MJ, Souza JSN, Brito de Andrade T, Gomes de Lemos TL, Coutinho HDM. Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates β -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. Ind Crops Prod. 2018; 112: 70–4. doi: doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.048
34. Chou T. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev. 2006; 58(3): 621-81; doi: doi.org/10.1124/pr.58.3.10
35. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents M26-A; Approved Guideline. Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.
36. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard, 3rd edn. CLSI document M31-A3. CLSI, Wayne, USA, 2008.
37. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, Pennsylvania, USA, 2013.
38. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; second informational supplement. CLSI document VET01-S2. Wayne, Pennsylvania, USA, 2013.

39. Corbellini CN. Actualización de la patogenia y diagnóstico de mastitis. Memorias del Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis, 1996, p. 37-48, Río Cuarto, Argentina.
40. Cockeran R, Mutepe ND, Theron AJ, Tintinger GR, Steel HC, Stivaktas PI, Richards GA, Feldman C, Anderson R. Calcium-dependent potentiation of the pro-inflammatory functions of human neutrophils by tigecycline in vitro. J Antimicrob Chemother. 2012; 67:130–137. doi: 10.1093/jac/dkr441
41. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis. 1998; 26(1): 1-12. doi: doi.org/10.1086/516284
42. Craig WA. The Role of Pharmacodynamics in Infective Treatment of Community-Acquired Pathogens. Advances Studies in Medicine. 2002; 2: 126-134.
43. Croes S, Beisser PS, Terporten PH, Neef C, Deurenberg RH, Stobberingh EE. Diminished in vitro antibacterial activity of oxacillin against clinical isolates of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2010; 16(7): 979-85. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.02956.x
44. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). En Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 1ra. Edición. Buchanan B, Gruissen W, Jones R (eds). New Jersey: ASPB and Wiley, 2000, Capítulo 24.
45. Curado MA, Oliveira CBA, Jesus JG, Santos SC, Seraphin JC, Ferri PH. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. Phytochemistry. 2006; 67(21): 2363–9. doi: doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.002
46. D'Arrigo M, Ginestra G, Mandalari G, Furneri PM, Bisignano G. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea

- tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Phytomedicine. 2010; 17(5): 317–22. doi: 10.1016/j.phymed.2009.07.008
47. Dai J, Zhu L, Yang L, Qiu J. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*. EXCLI J. 2013; 12: 479–90.
48. de los Santos R, Zunino P, Gil A, Laport A, Hirigoyen D. Resistencia a los antibióticos de *Staphylococcus aureus* asociada con mastitis subclínica y clínica en Uruguay durante un período de ocho años. Austral j vet sci. 2017; 49(3). doi: dx.doi.org/10.4067/S0719-81322017000300191
49. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochim Biophys Acta. 2009; 1794(5): 808-16. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005
50. Easmon CS. The effect of antibiotics on the intracellular survival of *Staphylococcus aureus* in vitro. Br J Exp Pathol. 1979; 60(1): 24-28.
51. Egea AL, Galletti PS, Lamberghini R, Faccone DF, Lucero C, Vindel A, Tosoroni D, Garnerio A, Saka H, Galas M, *S. aureus* Study Group-Argentina, Bocco J, Corso A, Sola C. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. Int J Med Microbiol. 2014; 304(8): 1086-99. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.08.002.
52. Eliopoulos GM. Synergism and antagonism. Pharmacology; 1989 3(3): 399-406.
53. El-Sayed A, Alber J, Lammler C, Jager S, Woter W, Vázquez H. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. Vet Mex. 2006; 37: 165–179.
54. Elshafie HS, Mancini E, Sakr S, de Martino L, Mattia CA, de Feo V, Camele I. Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L.

- essential oil against postharvest disease of peach fruit. J Med Food. 2015; 18(8): 929-34. doi: 10.1089/jmf.2014.0167
55. EMA. 2014 Answers to the requests for scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals: 18 December 2014 EMA/381884/2014. Veterinary Medicines Division/CVMP/CHMP
56. Errecalde J. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Estudio de incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. FAO. Roma, 2004.
57. Erskine RJ, Wagner S, DeGraves FJ. Mastitis therapy and pharmacology. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2003; 19(1): 109-138. doi: doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00067-1
58. European Medicines Agency (EMA). Answers to the requests for scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals. European Medicines Agency, Veterinary Medicines Division/CVMP/ CHMP, EMA/381884/2014, London, 2014.
59. Falci, S.P.P., Teixeira, M.A., Chagas, P.F., Martinez, B.B., Teixeira Loyola, A.B.A., Ferreira, L.M., y Veiga, D.F. (2015). Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. Acta Cir Bras. 2105; 30(7): 491-6. doi: dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150070000007
60. Farag RS, Shalaby AS, El-Baroty GA, Ibrahim NA, Ali MA, Hassan EM. Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. Phytother Res. 2004;18(1): 30-5. doi: 10.1002/ptr.1348
61. Farmacopea Argentina. Séptima Edición, Volúmen 1. Ministerio de salud de la nación, ANMAT, INAME. Buenos Aire, 2003.

62. Federman C, Joo J, Almario JA, Salaheen S, Biswas D. Citrus-derived oil inhibits *Staphylococcus aureus* growth and alters its interactions with bovine mammary cells. J Dairy Sci. 2016; 99(5): 3667-3674. doi: 10.3168/jds.2015-10538
63. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol. 2005; 3: 948–958. doi: 10.1038/nrmicro1289.
64. Francoz D, Wellemans V, Dupré JP, Roy JP, Labelle F, Lacasse P, Dufour S. Invited Review: A Systematic Review and Qualitative Analysis of Treatments Other Than Conventional Antimicrobials for Clinical Mastitis in Dairy Cows. J Dairy Sci. 2017; 100(10): 7751-7770. doi: 10.3168/jds.2016-12512
65. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. Lancet. 2003; 362: 887-99. doi: doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14333-4
66. Garg T, Rath G, Murthy RR, Gupta UD, Vatsala PG, Goyal AK. Current Nanotechnological Approaches for an Effective Delivery of Bioactive Drug Molecules to Overcome Drug Resistance Tuberculosis. Curr Pharm Des. 2015; 21(22): 3076-3089. doi:10.2174/1381612821666150531163254
67. Gentilini E, Denamiel G, Llorente P, Godaly S, Rebuelto M, DeGregorio O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. J Dairy Sci. 2000; 83: 1224–1227. doi: doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74988-5
68. Gibbons S, Oluwatuyi M, Veitch NC, Gray AI. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. Phytochemistry. 2003; 62(1): 83-7. doi: 10.1016/s0031-9422(02)00446-6
69. Giesecke WH. Bovine mastitis. Science Bulletin, N°401. Department of Agriculture, Pretoria, 1983.
70. Gill AO, Holley RA. Disruption of *E. coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. Int J Food Microbiol. 2006; 108(1): 1-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009

71. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and molecular perspective. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 267–274. doi: doi.org/10.1128/aac.46.2.267-274.2002.
72. Gobernado M, Ponce J. Rifaximina. Rev Esp Quimioter. 2004; 17(2): 141-53.
73. Goldstein BP. Resistance to rifampicin: a review. J Antibiot (Tokyo). 2014; 67(9): 625-630. doi: 10.1038/ja.2014.107
74. Gomes F, Henriques M. Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. Curr Microbiol. 2016; 72(4): 377– 382.
75. Gómez-Lus ML, Calvo A, Bouza E, Prieto J. Quimioterapia antiinfecciosa y antitumoral: Antibióticos y quimioterápicos. Generalidades. En: Farmacología básica y clínica. 20ª. Edición. Leza Cerro JC, Lizasoain Hernández I, Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Moro Sánchez MA (eds). Buenos Aires, Ed Panamericana, 2005, p. 825-839.
76. Govaerts R, Sobral M, Ashton P, Barrie F, Holst BK, Landrum LR, Matsumoto K, Fernanda Mazine F, Nic Lughadha E, Proença C, Silva LHS, Wilaon P, Lucas E. World Checklist of Myrtaceae. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew, 2008, p. 1-455.
77. Grattapaglia D, Vaillancourt RE, Shepherd M, Thumma BR, Foley W, Kulheim C, Potts BM, Myburg AA. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. Tree Genet Genomes. 2012; 8(3): 463-508.
78. Grob R, Barry E. Modern Practice of Gas Chromatography. 4ta. Edición. New York, John Wiley, 2004, 888 p.
79. Guimarães FF, Manzi MP, Joaquim SF, Richini-Pereira VB, Langoni H. Short communication: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. J Dairy Sci. 2017; 100: 726–730
80. Gumbo T, Louie A, Deziel MR, Liu W, Parsons LM, Salfinger M, Drusano GL. Concentration-dependent *Mycobacterium tuberculosis* killing and

- prevention of resistance by rifampin. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(11): 3781-3788. doi: 10.1128/AAC.01533-06
81. Haddadin AS, Fappiano SA, Lipsett PA. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. Postgrad Med J. 2002; 78(921): 385-92. doi: 10.1136/pmj.78.921.385
 82. Halberstein RA. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. Ann Epidemiol. 2005; 15(9): 686-699. doi: 10.1016/j.annepidem.2005.02.004
 83. Hand WL. Antibiotics and phagocytic cells. Antibimicrobic Newsletter. 1988; 5: 53-58. doi: doi.org/10.1016/0738-1751(88)90004-4
 84. Hand WL, King-Thompson NL. Contrast between phagocyte antibiotic uptake and subsequent intracellular bactericidal activity. Antimicrob Agents Chemother. 1986; 29: 135-140.
 85. Hameed KGA, Sender G, Korwin-Kossakowska A. Public health hazard due to mastitis in dairy cows. Anim Sci Pap Rep. 2007; 25(2): 73–85.
 86. Harrewijn P, van Oosten AM, Piron PGM. Natural terpenoids as messengers. A multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications. Ann Bot. 2002; 90(2): 299-300. doi:10.1093/aob/mcf187
 87. Hartmann G, Honikel KO, Knusel F, Nuesch J. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by ryfamycin. Biochim Biophys Acta. 1967; 145(3): 843-844. doi: 10.1016/0005-2787(67)90147-5
 88. Hase P, Digraskar S, Ravikanth K, Dandale M, Maini S. Management of subclinical mastitis with mastilep gel and herbal spray (AV/AMS/15). Int J Pharm Pract. 2013; 4: 64–67.
 89. Hayouni EA, Bouix M, Abedrabba M, Leveau JY, Hamdi M. Mechanism of action of *Melaleuca armillaris* (Sol. Ex Gaertu) Sm. essential oil on six LAB strains as assessed by multiparametric flow cytometry and automated microtiter-based assay. Food Chem. 2008; 111(3): 707–718.

90. Hebert A, Sayasith K, Senechal S, Dubreuil P, Lagace J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. FEMS Microbiol Lett. 2000; 193(1): 57-62. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09402.x
91. Hibbitt KG, Craven N, Batten EH. Anatomy, physiology and immunology of the udder, En: Bovine Medicine: Diseases and Husbandry. Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG (Eds.), Blackwell, Oxford, 1992, capítulo 20, p. 273–288
92. Holley RA, Patel D. Improved shelf life and safety of perishable foods using plant essential oils and smoked antimicrobials. Food Microbiol. 2005; 22(4): 273-92. doi: doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.006
93. Holmgren PK, Holmgren NH, Barnett LC. Index Herbariorum. The herbaria of the world. 8va. Edición. P 1. Bronx, New York Botanical Gardens, 1990.
94. Hoover WW, Gerlach EH, Hoban DJ, Eliopoulos GM, Pfaller MA, Jones RN. Antimicrobial activity and spectrum of rifaximin, a new topical rifamycin derivative. Diagn Microbiol Infect Dis. 1993; 16(2): 111-8. doi: 10.1016/0732-8893(93)90004-q
95. Hu S, Concha C, Johannisson A, Meglia G, Waller KP. 2001. Effect of Subcutaneous Injection of Ginseng on Cows with *Subclinical Staphylococcus aureus* Mastitis. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2001; 48(7): 519-528. doi: 10.1046/j.1439-0450.2001.00470.x
96. Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I, Lee RE. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. Nat Rev Microbiol. 2011; 9(1): 62-75. doi: 10.1038/nrmicro2474
97. Jaiswal AK, Jaiswal S. Modelling the effects of natural antimicrobials as food preservatives. En: Taylor M. (ed.) Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. 2014. pp. 259-284.
98. Jayaram R, Gaonkar S, Kaur P, Suresh BL, Mahesh BN, Jayashree R, Nandi V, Bharat S, Shandil RK, Kantharaj E, Balasubramanian V. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of rifampin in an aerosol infection

- model of tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(7): 2118-2124. doi: 10.1128/aac.47.7.2118-2124.2003
99. Joulain D, König WA. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E. B.-Verlag, Hamburg, 1998.
100. Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that Interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J Appl Bacteriol. 1994; 76(6): 626-31. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x
101. Kamaruzzaman NF, Chong SQY, Edmondson-brown KM. Bactericidal and anti-biofilm effects of polyhexamethylene biguanide in models of intracellular and biofilm of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Front Microbiol. 2017; 8: 1518. doi: 10.3389/fmicb.2017.01518
102. Kamaruzzaman NF, Kendall S, Good L. Targeting the hard to reach: challenges and novel strategies in the treatment of intracellular bacterial infections. Br J Pharmacol. 2017; 174: 2225–2236. doi: 10.1111/bph.13664
103. Kitchen BJ. Review of the progress of dairy science - bovine mastitis - milk compositional changes and related diagnostic-tests. J Dairy Res. 1981; 48(1): 167–188.
104. Klimecki W, Futscher B, Grogan T, Dalton W. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. Blood. 1994; 83.
105. Kloss WE, Schleir KH, Goirtz F. The genus *Staphylococcus*. En: The Prokaryotes. 2da. Edición. Balows A, Truper HG, Dwoekin M (eds). New York, Spring-Verlag, 1992.
106. Krömker V, Leimbach S. Mastitis treatment— Reduction in antibiotic usage in dairy cows. Reprod Dom Anim. 2017; 52(3): 21– 29. doi: doi.org/10.1111/rda.13032

- 107.Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, y col. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2001; 357(9264): 1225-1240. doi: 10.1016/s0140-6736(00)04403-2
- 108.Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol. 2001; 91(3): 453-62. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x
- 109.Langeveld WT, Veldhuizen EJ, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. Crit Rev Microbiol. 2014; 40(1): 76-94. doi: 10.3109/1040841X.2013.763219
- 110.LaPlante KL. In vitro activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 57(4): 413-418. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.09.007
- 111.Laufen H, Wildfeuer A. Kinetics of the uptake of antimicrobial agents by human polymorphonuclear leucocytes. Arzneimittelforschung. 1989; 39: 233–235.
- 112.Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis. 2002; 34(4): 482-92. doi: 10.1086/324626
- 113.Leitner G, Krifucks O, Kiran MD, Balaban N. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. Vet Immunol Immunopathol. 2011; 142: 25–35. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.03.023
- 114.Lemaire S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Intraphagocytic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* are susceptible to Meropenem and Cloxacillin: role of acid pH. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(5): 1627-1632. doi: 10.1128/AAC.01192-06

- 115.Lemaire S, Olivier A, Van Bambeke F, Tulkens PM, Appelbaum PC, Glupczynski Y. Restoration of Susceptibility of Intracellular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to β -Lactams: Comparison of Strains, Cells, and Antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(8): 2797-2805. doi: 10.1128/AAC.00123-08
- 116.Levy SB, FitzGerald GB, Macone AB. Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. N Engl J Med. 1976; 295(11): 583-588. doi: 10.1056/NEJM197609092951103
- 117.Li L, Li ZW, Yin ZQ, Wei Q, Jia RY, Zhou LJ, Xu J, Song X, Zhou Y, Du YH, Peng LC, Kang S, Yu W. Antibacterial activity of leaf essential oil and its constituents from *Cinnamomum longepaniculatum*. Int J Clin Exp Med. 2014; 7(7): 1721-7
- 118.Liu, M.Y., Cokcetin, N.N., Lu, J., Turnbull L, Carter DA, Whitchurch CB, Harry EJ. Rifampicin-Manuka Honey Combinations Are Superior to Other Antibiotic-Manuka Honey Combinations in Eradicating *Staphylococcus aureus* Biofilms. Front Microbiol. 2018; 8: 2653. doi: 10.3389/fmicb.2017.02653
- 119.Liu P, Rand KH, Obermann B, Derendorf H. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antibacterial activity of cefpodoxime and cefixime in in vitro kinetic models. Int J Antimicrob Agents. 2005; 25(2): 120-129. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.012
- 120.Livermore DM. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(9): 1941-1944. doi: 10.1093/jac/dkr262
- 121.Lowy FD. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2003; 111(9): 1265-73. doi: 10.1172/JCI18535
- 122.Lucas MF, Mestorino N, Errecalde J. Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. Analecta Vet. 2007; 27(1): 36-45.

123. Malinowski E, Lassa H, Smulski S, Klossowska A, Kaczmarowski M. (2008). Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from cows with mastitis in 2006-2007. Bull Vet Inst Pulawy. 2008; 52: 565–72.
124. Mancini E, Camele I, Elshafie HS, de Martino L, Pellegrino C, Grulova D, de Feo V. Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from different areas in the Southern Apennines (Italy). Chem Biodivers. 2014 Apr;11(4):639-51. doi: 10.1002/cbdv.201300326
125. Manjarrez JLA, Ávila Téllez A, Rosiles Martínez R, Fuentes Hernández VO. Determination Of Rifaximine In Milk Of Dairy Cows Using high Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Revista Científica, FCV-LUZ. 2012; 22(2): 112–119.
126. Manzaner Molina JJ. Flora Ornamental del centro urbano de Cabezo de Torres (Murcia). Proyecto de Fin de Carrera. Universidad Politecnica de Cartagena. 2005.
127. Marchetti ML, Errecalde J, Mestorino N. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine on antimicrobial agent susceptibility in multidrugresistant isogenic and veterinary *Escherichia coli* field strains. J Med Microbiol. 2012; 61(Pt 6): 786-792. doi: 10.1099/jmm.0.040204-0
128. McDowell R. Limitations for dairy production in developing countries. J Dairy Sci. 1981; 64(12): 2463-2474. doi: doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82871-8
129. McPhee CS, Anderson KL, Yeatts JL, Mason SE, Barlow BM, Baynes RE. Milk and plasma disposition of thymol following intramammary administration of a phytoceutical mastitis treatment. Int J Dairy Sci. 2011; 94(4): 1738-1743. doi: 10.3168/jds.2010-3988
130. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. Vet Microbiol. 2007; 125: 141–149. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.05.019.

131. Menozzi A, Dall' Aglio M, Quintavalla F, Dallavalle L, Meucci V, Bertini S. Rifaximin is an effective and safe alternative to metronidazole for the treatment of chronic enteropathy in dogs: a randomised trial. BMC Vet Res. 2016; 12: 217. doi: 10.1186/s12917-016-0851-0
132. Mensa J, Soriano A, Llinares P, Barberán J, Montejo M, Salavert M, Alvarez-Rocha L, Maseda E, Moreno A, Pasquau J, y col. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioter. 2013; 26(1): 1-84.
133. Mercier R, Kawai Y, Errington J. General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria. eLife. 2014; 3:642.
134. Mestorino N, Errecalde J. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic considerations for bovine mastitis treatment. En: A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine. Pérez Marín CC (edt). Croatia, InTech, 2012, p. 423-72. doi: 10.5772/31721
135. Mestorino N, Marchetti ML. Antimicrobianos parte 1. Microbiología Veterinaria. En Microbiología general. Stanchi N (edt). Intermédica, Argentina. Cap 19. 2019. En prensa.
136. Moghaddam M, Mehdizadeh L. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. Soft Chemistry and Food Fermentation. 2017; 13: 379-419. doi: 10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8
137. Modelling the growth and death of *Staphylococcus aureus* against *Melaleuca armillaris* essential oil at different pH conditions. Moncada Cárdenas Alejandro. 2017. Tesis Doctoral: Farmacocinética y Farmacodinamia celular de antimicrobianos utilizados en la terapia de la mastitis subclínica bovina. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/58588>
138. Monistero V, Graber HU, Pollera C, Cremonesi P, Castiglioni B, Bottini E, Ceballos-Marquez A, Lasso-Rojas L, Kroemker V, Wente N, Petzer IM, Santisteban C, Runyan J, Veiga Dos Santos M, Alves BG, Piccinini R, Bronzo V, Abbassi MS, Said MB, Moroni P. *Staphylococcus aureus* Isolates from

- Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. Toxins. 2018; 10(6): 247. doi: doi.org/10.3390/toxins10060247
139. Montenez JP, Van Bambeke F, Piret J, Brasseur R, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Interactions of macrolide antibiotics (Erythromycin A, roxithromycin, erythromyclamine [Dirithromycin], and azithromycin) with phospholipids: computer-aided conformational analysis and studies on acellular and cell culture models. Toxicol Appl Pharmacol. 1999; 156(2): 129-140. doi: 10.1006/taap.1999.8632
140. Moreno C, González R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello. 2009; 69: 192-185. [Online] doi: dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014
141. Mulazimoglu L, Tulkens PM, Van Bambeke F. Macrolides. En: Antimicrobial Therapy and Vaccines, Volume II: Antimicrobial Agents. 2da. Edición. Yu VL, Edwards G, McKinnon PS, Peloquin C, Morse GD (eds). Pittsburg, ESun Technologies, 2005, p. 243-280.
142. Mullen KA, Lee AR, Lyman RL, Mason SE, Washburn SP, Anderson KL. An *in-vitro* assessment of the antibacterial activity of plant derived oils. Int J Dairy Sci. 2014; 97(9): 5587-5591. doi: 10.3168/jds.2013-7806
143. Mueller M, de la Peña A, Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(2): 369-377. doi:10.1128/aac.48.2.369-377.2004
144. Murray P. Microbiología médica. 5ta. Edición. España, Elsevier, 2008.
145. Mushtaq S, Shah AM, Shah A, Lone SA, Hussain A, Hassan QP, Ali MN. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. Microb Pathog. 2018; 114: 357-361. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.024
146. Nascimento AM, Brandão MG, Oliveira GB, Fortes IC, Chartone-Souza E. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or

- β -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. Antonie Van Leeuwenhoek. 2007; 92(1): 95-100. doi: 10.1007/s10482-006-9139-x
147. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard. 3ra. Edición. Wayne, Pennsylvania, 1999, 99p.
148. Navarro-Cruz AR, Ochoa-Velasco CE, Caballero-Alvarez FJ, Lazcano-Hernández MA, Vera-López O, López-Malo A, Avila-Sosa R. Effect of pH and Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) Essential Oil Added to Carboxymethyl Cellulose and Starch Edible Films on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. J Food Qual. 2018; Article ID 1659394. doi: 10.1155/2018/1659394
149. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Pharmaceuticals (Basel). 2013; 6(12): 1451-1474. doi: 10.3390/ph6121451
150. Neder VE, Araujo L, Gianre VR, Calvinho LF. 2019. Susceptibilidad a antibióticos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en lecherías de la cuenca central de Argentina. Revista Engormix, Lechería, Artículos técnicos. Publicado [Online] el: 5/7/2019. <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/susceptibilidad-antibioticos-staphylococcusaureusaislados-mastitis-t43817.htm>
151. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. Science. 1992; 257(5073): 1064-1073.
152. Nikaido H, Thanassi DG. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: Tetracyclines and fluoroquinolones as examples. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 1393-1399.
153. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. Science. 1994; 264(5157): 382-388.

- 154.Oliveira KAR, Sousa JP, Medeiros JAC, Figueiredo RCBQ, Maganni M, de Siqueira JPJr, Leite de Souza E. Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. Food Control. 2015; 47: 334–339. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.014
- 155.Oliveira M, Nunes SF, Carneiro C, Bexiga R, Bernardo F, Vilela CL. Time course biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. Vet Microbiol. 2007; 124: 187–91. doi: doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.016
- 156.Oliveira L, Ruegg, PL. Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. J Dairy Sci. 2014; 97(9), 5426– 5436. doi: 10.3168/jds.2013-7756
- 157.Ong CT, Babalola CP, Nightingale CH, Nicolau DP. Penetration, efflux and intracellular activity of tigecycline in human polymorphonuclear neutrophils (PMNs). J Antimicrob Chemother. 2005; 56: 498–501. doi: 10.1093/jac/dki260
- 158.O’Neil J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Future Health and Wealth of Nations. London: Review on Antimicrobial Resistance. 2014.
- 159.Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Food and Agriculture Organization (FAO). OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027. Rome, OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018.
- 160.Organización Mundial de la Salud (OMSa). Antimicrobial resistance. Fact sheet. January 2018a. [ONLINE]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Accessed 10 May 2020.
- 161.Organización Mundial de la Salud (OMS). Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to

- non-human use. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. 2018b.
- 162.Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. J Food Prot. 2006; 69(5): 1046–55. doi: 10.4315/0362-028x-69.5.1046
- 163.Pankey GA, Sabath LD. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. Clin Infect Dis. 2004; 38(6): 864-70. doi: 10.1086/381972
- 164.Pauli A, Schilcher H. *In Vitro* antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia. En: Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. 6ta. Edición. Baser KHC, Buchbauer G (eds). Taylor & Francis: Boca Raton, 2010.
- 165.Pellegrino M, Frola I, Odierno L, Bogni C. Mastitis bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. REDVET- Rev electrón vet 2011; 12 (7): 1-14. [Online] <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070711.html>
- 166.Pemán J, Cantón E, Ramón MS, Jiménez T, Gobernado M. Penetración y actividad de los antimicrobianos en el interior de los fagocitos. Rev Esp Quimioterap. 1991; 4: 27-36.
- 167.Persson Waller K, Hårdemark V, Nyman AK, Duse A. Veterinary treatment strategies for clinical mastitis in dairy cows in Sweden. Vet Rec. 2016; 178(10): 240. 10.1136/vr.103506
- 168.Piatkowska, E., Piatkowski, J., y Przondo-Mordarska, A. The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* to erythromycin is caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. Cell Mol Biol Lett. 2012; 17(4): 633-45. doi: 10.2478/s11658-012-0034-3

169. Piccinini R, Borromeo V, Zecconi A. Relationship between *Staphylococcus aureus* gene pattern and dairy herd mastitis. Vet Microbiol. 2010; 145: 100–105. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.005
170. Piechota M, Kot B, Zdunek E, Mitrus J, Wicha J, Wolska MK, Sachanowicz K. Distribution of classical enterotoxin genes in staphylococci from milk of cows with- and without mastitis and the cowshed environment. Pol J Vet Sci. 2014; 17: 407–411. doi: 10.2478/pjvs-2014-0058.
171. Pillai SK, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine. 5ta. Edición. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2005.
172. Pistiki A, Galani I, Pylaris E, Barbatzas C, Pimentel M, Guiamarellos-Bourboulis EJ. *In vitro* activity of rifaximin against isolates from patients with small intestinal bacterial overgrowth. Int J Antimicrob Agents. 2014; 43(3): 236–241. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.12.008
173. Plaza M, Ricalde M. Establecer parámetros de control de calidad físico-químicos del AE del *Schinus molle* l. obtenido por arrastre de vapor. Revista Ciencia, Tecnología e Innovación. 2015; 11 (12): 693-6.
174. Plesiat P, Nikaido H. Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. Mol Microbiol. 1992; 6(10): 1323-1333. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb00853.x
175. Pol M, Chaves J, Carrera C, Courrier E. Rifaximin-Cefacetril Treatments of Clinical Mastitis: Efficacy of One-day Treatment Compared to Two-day Treatment. 57th Annual Meeting of National Mastitis Council, 2018, Tucson, Arizona.
176. Prakash B, Veeragowda BM, Krishnappa G. Biofilms: A survival strategy of bacteria. Current Sci. 2003; 85: 1299-1307
177. Prescott JF. Lincosamidas, macrólidos y pleuromutilinas. En: *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. Prescott JF, Baggot JD, Walter RD (eds). 3ra. Edición. Argentina, Ed Intermédica, 2002, p. 204-32.

- 178.Rahman S, Ali T, Ali I, Khan N, Han B, Gao J. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum β -lactamases. Biomed Res Int. 2018; 2018: 9519718. doi: 10.1155/2018/9519718
- 179.Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. Ind Crops Prod. 2014; 62: 250–64. doi: doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055
- 180.Raza A, Muhammad G, Sharif S, Atta A. Biofilm Producing Staphylococcus aureus and Bovine Mastitis: A Review. Molecular Microbiology Research. 2013; 3(1): 1-8 doi: 10.5376/mmr.2013.03.0001
- 181.Renard C, Vanderhaeghe HJ, Claes PJ, Zenebergh A, Tulkens PM. Influence of conversion of penicillin G into a basic derivative on its accumulation and subcellular localization in cultured macrophages. Antimicrob Agents Chemother. 1987; 31: 410-416.
- 182.Resh IA, Sarkar TK, Malik H, Muhee A, Shoukat S. Efficacy of *Fumaria indica*, *Nepata cataria* and *Adiantum capillus* crude aqueous extracts in comparison to Cefuroxime in sub-clinical cases of bovine mastitis. Int J Lakes Rivers (IJLR). 2017; 7: 100–107. doi: 10.5455/ijlr.20170212032414
- 183.Rioba NB, Itulya FM, Saidi M, Dudai N, Bernstein N. Effects of nitrogen, phosphorus and irrigation frequency on essential oil content and composition of sage (*Salvia officinalis* L.). J Appl Res Med Aromat Plants. 2015; 2(1): 21–9.
- 184.Rizk M, Ibrahim N, El-Rigal N. Comparative *In vivo* Antioxidant Levels in *Schistosoma mansoni* Infected mice Treated with Praziquantel or Essential Oil of *Melaleuca armillaris* Leaves. Pak J Biol Sci. 2012; 15(20): 971-978. doi: 10.3923/pjbs.2012.971.978
- 185.Roberson JR. Treatment of clinical mastitis. Vet Clin Food Anim. 2012; 28(2): 271–288. doi: doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.011
- 186.Rodrigues FF, Costa JG, Coutinho HD. (2009). Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*.

- Phytomedicine. 2009; 16(11): 1052-1055. doi: 10.1016/j.phymed.2009.04.004
187. Rodríguez P, Sierra W, Rodríguez S, Menéndez P. Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of *Eucalyptus* oils. Electron J Biotechnol. 2006; 9(3). [Online] doi: dx.doi.org/10.4067/S0717-34582006000300011
188. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Antonietta Milillo M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. Phytomedicine. 2007; 14(11): 727-32. doi: 10.1016/j.phymed.2007.01.005
189. Ruegg PL. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. J Dairy Sci. 2017; 100:10381–97. doi: 10.3168/jds.2017-13023.
190. Russi NB, Maito J, Dieser SA, Renna MS, Signorini ML, Camussone C, Neder VE, Pol M, Tirante L, Odierno LM, Calvinho LF. Comparison of phenotypic tests for detecting penicillin G resistance with presence of blaZ gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections. J Dairy Res. 2015; 82: 317-321. doi: 10.1017/S0022029915000242
191. Sádaba B, Azanza JR. Antibióticos macrólidos y otros antibióticos. En: Velásquez Farmacología básica y clínica. 20ª Edición. Leza Cerro JC, Lizasoain Hernández I, Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Moro Sánchez MA (eds). Buenos Aires, Ed. Panamericana, 2005, p. 825-839.
192. Sanchez MS, Ford CW, Yancey RJ. Evaluation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus aureus* surviving within bovine mammary gland macrophages. J Antimicrob Chemother. 1988; 21(6): 773-86. doi: 10.1093/jac/21.6.773
193. Sears PM, Fettinger M, Marsh-Salin J. Isolation of L-form variants after antibiotic treatment in *Staphylococcus aureus* bovine mastitis. J Am Med Assoc. 1987; 191:681-684.

- 194.Seral C, Carryn S, Tulkens PM, Van Bambeke F. Influence of P-glycoprotein and MRP efflux pump inhibitors on the intracellular activity of azithromycin and ciprofloxacin in macrophages infected by *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 1167–1173. doi: 10.1093/jac/dkg223.
- 195.Shafi TA, Bansal BK, Gupta DK, Nayyar S. Evaluation of immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* in bovine subclinical mastitis. Turk J Vet Anim Sci. 2016; 40: 352–358. doi: 10.3906/vet-1506-96
- 196.Shryock TR, Mortensen JE, Baumholtz M. The effects of macrolides on the expression of bactericidal virulence mechanisms. J Antimicrob Chemother. 1998; 41(5): 505-512. doi: 10.1093/jac/41.5.505
- 197.Shmidt E. Production of essential oils. En: Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Baser KHC, Buchbauer G (eds.). Taylor & Francis, Boca Raton, 2010.
- 198.Si H, Hu J, Liu Z, Zeng ZL. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β -lactamase- producing *Escherichia coli*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008; 53(2): 190-194. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00414.x
- 199.Siani AC, Tappin MR, Ramos MF, Mazzei JL, Ramos MC, De Aquino Neto FR, Frighetto N. Linalool from *Lippia alba*: study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. J Agric Food Chem. 2002; 50(12): 3518-3521. doi: 10.1021/jf011592n
- 200.Siddique S, Parveenb Z, Barea F, Chaudhary MN, Mazhar S, Nawaz S. The essential oil of *Melaleuca armillaris* (Sol. ex Gaertn.) Sm. leaves from Pakistan: A potential source of eugenol methyl ether. Ind Crops Prod. 2017; 109: 912-917. doi: doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.048
- 201.Sidhu P, Landoni M, Aliabadi F, Lees P. PK-PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. Res Vet Sci. 2010; 88(1): 134-141. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.05.013

- 202.Sifri CD, Barech-Bernal A, Calderwood SB, von Eiff C. Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model. Infect Immun. 2006; 74(2): 1091-1096. doi: 10.1128/IAI.74.2.1091-1096.2006
- 203.Silva CJ, Barbosa LC, Maltha CR, Pinheiro AL, Ismail FM. Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. Flavour Fragr J. 2007; 22(6): 474–478. doi: doi.org/10.1002/ffj.1823
- 204.Smulski S, Edward M, Michal K, Henryka L. Occurrence, forms and etiologic agents of mastitis in Poland depending on size of farm. Med Weter. 2011; 67: 190–193.
- 205.Sprat BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science. 1994; 264: 388–393. doi: doi.org/10.1126/science.8153626.
- 206.Srednika ME, Crespia E, Testorellia MF, Puigdevalla T, Pereyra AMD, Rumi MV, Caggiano N, Gulone L, Mollerach M, Gentilini ER. First isolation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Argentina. Vet Anim Sci. 2019; 7: 100043. doi: doi.org/10.1016/j.vas.2018.11.004
- 207.Steinberg TH, Hand WL. Effects of phagocytosis on antibiotic and nucleoside uptake by human polymorphonuclear leucocytes. J Infect Dis. 1984; 149(3): 397-403. doi: 10.1093/infdis/149.3.397
- 208.Suojala L, Kaartinen L, Pyörälä S. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis – An evidence-based approach. J Vet Pharmacol Ther. 2013; 36(6): 521– 531. doi: 10.1111/jvp.12057
- 209.Stashenko EE. AEs. División de Publicaciones, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. 2009.
- 210.Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. Evid Based Complement Alternat Med. 2016; ID3012462, 21p. doi: dx.doi.org/10.1155/2016/3012462

- 211.Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control. 2006; 34(5 Suppl 1), S3-10; S64-73. doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.219
- 212.Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnel CP, Muthukumarappan K, Bourke P, Cullen PJ. Aplicación de antimicrobianos naturales para la conservación de alimentos. J Agric Food Chem. 2009; 57: 5987-6000.
- 213.Tremblay YDN, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messier S, Jacques M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. J Dairy Sci. 2013; 96: 234–46. doi: 10.3168/jds.2012-5795
- 214.Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(6): 2474-2478. doi: 10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005
- 215.Tullio V, Mandras N, Allizond V, Nostro A, Roana J, Merlino C, Banche G, Scalas D, Cuffini AM. Positive interaction of thyme (red) essential oil with human polymorphonuclear granulocytes in eradicating intracellular *Candida albicans*. Planta medica. 2012; 78(15): 1633–1635. doi: 10.1055/s-0032-1315153
- 216.Tullio V, Roana J, Scalas D, Mandras N. Enhanced Killing of *Candida krusei* by Polymorphonuclear Leucocytes in the Presence of Subinhibitory Concentrations of *Melaleuca alternifolia* and "Mentha of Pancalieri" Essential Oils. Molecules. 2019; 24(21): 3824. doi: doi.org/10.3390/molecules24213824
- 217.Turnidge JD. The pharmacodynamics of β -lactams. Clin Inf Dis. 1998; 27: 10-22.
- 218.Toutain PL, BOUSQUET-M A. Plasma terminal half-life. J Vet Pharmacol Ther. 2004; 27(6): 427–439

219. Toutain PL, del Castillo JR, Bousquet-Mélou A. The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. Res Vet Sci. 2002; 73(2): 105-114. doi:10.1016/s0034-5288(02)00039-5
220. Toutain PL, Lees P. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. J Vet Pharmacol Ther. 2004; 27(6): 467-477. doi:10.1111/j.1365-2885.2004.00613.x
221. Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Arch Microbiol. 2000; 174(4): 233-238. doi: 10.1007/s002030000199
222. Ultee A, Smid EJ. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. Int J Food Microbiol. 2001; 64(3): 373-378. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00480-3
223. Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(4): 1561-1568. doi: 10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002
224. Van Bambeke F. Macrolides and Ketolides. En: *Fundamentals of Antimicrobial Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Eds. Alexander A. Vinks, Hartmut Derendorf and Johan W. Mouton. New York, Ed Springer, 2014, p. 257-279.
225. Van den Broek PJ. Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes. Rev Infect Dis. 1989; 11: 213-245.
226. Van der Auwera P, Prinz G, Petrikos G. Activity of intracellular antibiotics. Infection. 1991; 19: S216–S223. doi: 10.1007/BF01644037
227. Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional

- antimicrobials. Lett Appl Microbiol. 2009; 48(4): 440-446. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x
228. Van Vuuren, S., y Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies— Methods and approaches to study the interaction between natural products. Planta Med. 2011; 77(11): 1168-1182. doi: 10.1055/s-0030-1250736
229. Vaudaux P, Waldvogel FA. Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob Agents Chemother. 1979; 16: 743–749. doi: 10.1128/AAC.16.6.743.
230. Vazifeh D, Abdelghaffar H, Labro MT. Cellular accumulation of the new ketolide RU 64004 by human neutrophils: Comparison with that of azithromycin and roxithromycin. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 2099-2107.
231. Vazifeh D, Preira A, Bryskier A, Labro MT. Interactions between HMR 3647, a new ketolide, and human polymorphonuclear neutrophils. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42: 1944–1951. doi: 10.1128/AAC.42.8.1944.
232. Villa P, Sassella D, Corada M, Bartosek I. Toxicity, uptake, and subcellular distribution in rat hepatocytes of roxithromycin, a new semisynthetic macrolide, and erythromycin base. Antimicrob Agents Chemother. 1988; 32(10): 1541–1546. doi: 10.1128/aac.32.10.1541
233. Weidmann C, Dell' Elce A. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de marbofloxacin sobre escherichia coli; entre la biología descriptiva y el modelo matemático. XXI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral, 2017. Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/1893>
234. Weinrick B, Dunman PM, McAleese F, Murphy E, Projan SJ, Fang Y, Novick RP. Effect of mild acid on gene expression in Staphylococcus aureus. J

- bacteriol. 2004; 186(24), 8407–8423. doi: 10.1128/JB.186.24.8407-8423.2004
235. Wiley/NIST. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 8th Ed. J. Wiley & Sons, Inc., New York/NIST/EPA/NIH (2005) Mass Spectral Library, vers. 2.0. (2008).
236. Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. Am J Bot. 2001; 88(11): 2013-2025. doi: doi.org/10.2307/3558428
237. Whiting R, Buchanan R. Scientific status summary: microbial modeling. Food Technology (USA), 1994.
238. Wolter W, Castañeda VH, Kloppert B, Zschoeck M. La Mastitis Bovina: Mecanismo de defensa y protección de la ubre bovina, patogénesis de la mastitis. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, Jalisco, 2004, p.17- 54.
239. Xiong YQ, Caillon J, Drugeon H, Potel G, Baron D. Influence of pH on adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and their postantibiotic effects. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(1): 35-39. doi:10.1128/AAC.40.1.35
240. Yáñez Rueda X, Cuadro Mogollón OF. Composición química y actividad antibacteriana del AE de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2012; 10(1): 52-61.
241. Yap PS, Yiap BC, Ping HC, Lim SHE. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. Open Microbiol J. 2014; 8: 6-14. doi: 10.2174/1874285801408010006
242. Yancey RJ, Sanchez MS, Ford CW. Activity of Antibiotics against *Staphylococcus aureus* within Polymorphonuclear Neutrophils. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1991; 10(2): 107-113. doi: 10.1007/BF01964421
243. Zadoks RN, van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, van Belkum A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine

- and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. J Clin Microbiol. 2002; 40(11): 3894-3902. doi: 10.1128/jcm.40.11.3894-3902.2002
- 244.Zandarín A, Rampone A, Giraudo J, Calzolar A. Inducción de cápsula de *Staphylococcus aureus* “*in vivo*” e “*in vitro*”. Memorias del Congreso Nacional de Calidad de la leche y Mastitis, 1996, poster A-3:5-6, Río Cuarto, Argentina.
- 245.Zhou K, Li C, Chen D, Pan Y, Tao Y, Qu W, Liu Z, Wang X, Xie S. A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus*. Int J Nanomedicine. 2018; 13: 7333-7347. doi:10.2147/IJN.S169935
- 246.Ziv G. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy— 2. Practical and therapeutic applications. Vet Med Small Anim Clin. 1980; 75(3): 469-474.
- 247.Zwietering M, Jongenburger I, Rombouts F, Van't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology, 1990: 56(6): 1875-1881.